

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

“Microbiota intestinal y su relación con el estado nutricional en niños, caso de estudio: Monte Sinaí”

PROYECTO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del Título de:

**MASTER EN BIOCENCIAS APLICADAS CON MENCIÓN EN
BIODESCUBRIMIENTO**

Presentada por:

Carlos David Ordóñez Rosero

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2025

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico a mis padres, Grenli Ordóñez y Cecilia Rosero, y a mi prometida, Eilen Mera, por su apoyo invaluable en el transcurso del programa de maestría; quienes con sus palabras y acciones me motivaron a creer en mí mismo y a poder alcanzar esta meta que veía difícil de alcanzar.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora Diana Carvajal, PhD., quien desde mis estudios de pregrado me ha apoyado en mi trayectoria académica e investigativa, guiándome, aconsejándome y cultivando en mí un espíritu de investigador.

Declaración Expresa

Yo Carlos David Ordóñez Rosero acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor. El estudiante deberá procurar en cualquier caso de cesión de sus derechos patrimoniales incluir una cláusula en la cesión que proteja la vigencia de la licencia aquí concedida a la ESPOL.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, secreto empresarial, derechos patrimoniales de autor sobre software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 26 de mayo del 2025.

Carlos David Ordóñez Rosero

Evaluadores

Diana Gabriela Carvajal Aldaz, PhD.

Tutora de proyecto

Katty Elizabeth Cabezas Terán, MSc.

Co-tutora de proyecto

Fernanda Bertuccez Cordeiro, PhD.

Evaluadora

Sara Carolina Flores Madrid, MSc.

Evaluadora

Resumen

Existe cada vez más evidencia indicando que la composición de la microbiota intestinal de los niños puede influir en la malnutrición infantil. Actualmente, no existe evidencia disponible de esta relación en Ecuador. El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la composición de la microbiota intestinal en niños sanos y malnutridos de Monte Sinaí para identificar marcadores microbianos asociados con la salud y la malnutrición. Este fue un estudio observacional transversal con aprobación de comité de ética. Se reclutaron niños menores de 5 años que vivían en Monte Sinaí, Ecuador, tras obtener el consentimiento informado de sus padres o tutores. Los participantes fueron categorizados según un criterio de diagnóstico nutricional y su estado de anemia. Se extrajo ADN de muestras fecales y se realizó secuenciación del gen 16S rRNA. Se incluyeron 18 niños en el estudio. No hubo diferencias significativas en la diversidad alfa o beta entre los niños en riesgo de malnutrición o anemia y sus contrapartes saludables. El análisis de abundancia diferencial mostró que los taxones *Butyricimonas*, *Blautia_A_141781*, *CAG-41* y *UBA1381* eran significativamente menos abundantes en niños en riesgo de desnutrición ($p_{\text{adj}} < 0.1$) en comparación con sus contrapartes saludables. Además, los taxones *Porphyromonadaceae*, *Porphyromonas_A_859424*, *Butyricimonas* y *UMGS1071* eran significativamente menos abundantes en niños que sufrían anemia ($p_{\text{adj}} < 0.05$). Los hallazgos sugieren que el perfil de microbiota intestinal de los niños en riesgo de desnutrición o que sufren anemia está empobrecido en *Butyricimonas*.

Palabras clave: microbiota intestinal, malnutrición, anemia, microbioma.

Abstract

*Increasing evidence indicates that the composition of children's gut microbiota can influence children malnutrition. Currently, there is no available evidence of this relationship in Ecuador. The primary objective of this research was to evaluate the composition of the gut microbiota in healthy and malnourished children from Monte Sinai to identify microbial markers associated with health and malnutrition. This was a cross-sectional observational study approved by an ethics committee. Children living in Monte Sinai, Ecuador who were 5 years or younger were recruited after obtaining their parents/guardians informed consent. Participants were categorized according to a nutrition diagnosis criterion and by their anemia status. DNA was extracted from stool samples and 16S rRNA gene sequencing was performed. 18 children were included. There were no significant differences in alpha or beta diversity between children at risk of malnutrition or anemia and their healthy counterparts. Differential abundance analysis showed that the taxa *Butyricimonas*, *Blautia_A_141781*, *CAG-41* and *UBA1381* were significantly less abundant in children at risk of malnutrition ($p_{adj} < 0.1$) compared to their healthy counterparts. Furthermore, the taxa *Porphyromonadaceae*, *Porphyromonas_A_859424*, *Butyricimonas* and *UMGS1071* were significantly less abundant in children who suffered from anemia ($p_{adj} < 0.05$). The findings suggest that the gut microbiota profile of children at risk of malnutrition or suffering from anemia is depleted in *Butyricimonas*.*

Keywords: gut microbiota, children malnutrition, anemia, microbiome

Índice general

| | |
|--|-----|
| Resumen | I |
| <i>Abstract</i> | II |
| Índice general | III |
| Abreviaturas | IV |
| Simbología | V |
| Índice de figuras | VI |
| Índice de tablas..... | VI |
| Capítulo 1 | 1 |
| 1.1 Introducción | 2 |
| 1.2 Descripción del Problema | 2 |
| 1.3 Justificación del Problema | 3 |
| 1.4 Objetivos | 4 |
| <i>1.4.1 Objetivo general</i> | 4 |
| <i>1.4.2 Objetivos específicos</i> | 4 |
| 1.5 Marco teórico | 4 |
| Capítulo 2 | 8 |
| 2. Metodología. | 9 |
| Capítulo 3 | 19 |
| 3. Resultados y análisis | 20 |
| Capítulo 4 | 32 |
| 4. Conclusiones y recomendaciones..... | 33 |
| <i>4.1. Conclusiones</i> | 33 |
| <i>4.2 Recomendaciones</i> | 33 |
| Referencias | 35 |
| Apéndices | 42 |

Abreviaturas

| | |
|----------|--|
| A | Anemia |
| ACP | Análisis de Componentes Principales |
| ADE | Amplitud de distribución Eritrocitaria |
| ANCOM-BC | Análisis de Composición de Microbiomas con Corrección de Sesgo |
| CHCM | Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media |
| ENDI | Encuesta Nacional sobre Desnutrición Infantil |
| Hb | Hemoglobina |
| HCM | Hemoglobina Corpuscular Media |
| INEC | Instituto Nacional de Estadística y Censos |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| RDW | Ancho de Distribución de Glóbulos Rojos |
| RM | Con malnutrición o en riesgo |
| SA | Sin Anemia |
| SCFAs | Ácidos Grasos de Cadena Corta |
| SM | Sin Riesgo de Malnutrición |
| VCM | Volumen Corpuscular Medio |

Simbología

cm Centímetro

dl Decilitro

fl Fentolitro

g Gramo

kg Kilogramo

pg Picogramo

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. <i>Alfa diversidad según los grupos de estudio</i> | 22 |
| Figura 2. <i>Biplot ACP según los grupos de estudio</i> | 24 |
| Figura 3. <i>Abundancia relativa bacteriana promedio a nivel de filo de los grupos de estudio</i> | 26 |
| Figura 4. <i>Abundancia diferencial según diagnóstico nutricional</i> | 28 |
| Figura 5. <i>Abundancia diferencial según estatus de anemia</i> | 30 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. <i>Signos clínicos de malnutrición considerados en la exploración física orientada a la nutrición.</i> | 12 |
| Tabla 2. <i>Criterios de interpretación de hemograma según edad</i> | 13 |
| Tabla 3. <i>Características de la población según diagnóstico nutricional</i> | 20 |
| Tabla 4. <i>Características de la población según estatus de anemia</i> | 21 |
| Tabla 5. <i>Resultados de abundancia diferencial según diagnóstico nutricional</i> | 28 |
| Tabla 6. <i>Resultados de abundancia diferencial según estatus de anemia</i> | 29 |

Capítulo 1

1.1 Introducción

1.2 Descripción del Problema

La malnutrición es una pandemia que afecta a millones de niños alrededor del mundo perjudicando profundamente su crecimiento y desarrollo. Se presenta en diferentes formas, teniendo en un extremo a individuos muy delgados propensos a enfermedades infecciosas y a obesos en el otro extremo. A nivel mundial, uno de cada tres niños menores de cinco años padece de malnutrición, lo que se traduce en retraso en el crecimiento, emaciación o sobrepeso. Además, la mayor carga de todas las formas de malnutrición prevalece en los niños y jóvenes de las comunidades marginales y de escasos recursos, perpetuando la pobreza generacional (UNICEF, 2019a).

A finales del 2024, el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) del Ecuador publicó los principales resultados de la segunda ronda (2023 - 2024) de la Encuesta Nacional sobre Desnutrición Infantil (ENDI) revelando que el país enfrenta una prevalencia de 17.5% de desnutrición crónica infantil en niños menores de 5 años, posicionando a Ecuador como el cuarto país de Latinoamérica con mayor prevalencia, siendo superado solamente por Honduras, Haití y Guatemala. Por otro lado, existe una prevalencia del 5% a nivel nacional de sobrepeso y obesidad en niños de 2 a 5 años (Herrera et al., 2024). La malnutrición puede ser combatida abordando las diferentes etapas de la vida del niño y colocando las necesidades nutricionales de los niños como prioridad de los sistemas alimentarios y los sistemas de apoyo en salud, agua y saneamiento, educación y protección social (UNICEF, 2019a).

La causa de la malnutrición es compleja y se presenta como una interacción de varios factores, incluyendo la pobreza, la inseguridad alimentaria, las prácticas poco higiénicas, las enfermedades y el analfabetismo (Balasubramaniam et al., 2021a; UNICEF, 2019a). Además, la interacción entre la desnutrición y las enfermedades infecciosas desencadena un ciclo potencialmente letal que predispone a los niños a sufrir infecciones recurrentes, lo cual retrasa su

recuperación debido a un estado inmunológico deficiente (Balasubramaniam et al., 2021a). Cabe recalcar que los niños desnutridos suelen padecer de disbiosis, condición que altera el equilibrio de la microbiota intestinal provocando una disminución en la actividad inmunológica del intestino y permitiendo el crecimiento de bacterias enteropatógenas lo cual conlleva a inflamación del tracto digestivo, irritación de la mucosa intestinal y una capacidad reducida para la absorción de nutrientes (Gatya et al., 2022).

1.3 Justificación del Problema

A menos que se aborde la problemática de la malnutrición infantil, que tiene gran relevancia tanto a nivel nacional como global, los niños y las sociedades no podrán alcanzar su máximo potencial. Tal como se mencionó anteriormente, existe una relación entre la malnutrición infantil y la microbiota. Entre las microbiotas del cuerpo humano, la que se encuentra en el intestino es de particular interés debido a su rol en la regulación de diversas rutas metabólicas del huésped. Estudios recientes han demostrado una estrecha correlación entre las enfermedades humanas y su microbiota intestinal, lo que ha llevado a intentos para aplicarlo clínicamente (Baek et al., 2022).

El área de investigación de la microbiota posee un gran potencial y se espera que brinde nuevas oportunidades para el tratamiento de enfermedades y el desarrollo de medicamentos (Valencia et al., 2017). Hasta el momento, no se han publicado estudios sobre la composición de la microbiota intestinal y salud nutricional en niños en el Ecuador. Los reportes de investigaciones similares, realizadas en poblaciones con características similares al del presente estudio, han sido México (Moran-Ramos et al., 2020) y Brasil (Chew et al., 2020). Por lo tanto, el presente estudio, al leer saber y entender del autor, sería el primero en realizarse en el Ecuador y países vecinos sobre la composición de la microbiota intestinal en niños que se encuentran en riesgo de malnutrición, lo cual permitirá ampliar la comprensión de la relación que existe entre la abundancia de los diferentes taxones bacterianos con la malnutrición.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la composición de la microbiota intestinal en niños sanos y malnutridos de Monte Sinaí para la identificación de marcadores microbianos asociados a salud y enfermedad.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Analizar el impacto de la malnutrición sobre la diversidad bacteriana.
2. Identificar los taxones bacterianos predominantes en el intestino de niños sanos y malnutridos.

1.5 Marco teórico

El tracto gastrointestinal humano alberga una diversa y compleja comunidad de microorganismos constituida por bacterias, virus, y algunos eucariotas a lo largo de toda su extensión, los cuales influyen en los procesos fisiológicos de su hospedero (Gomaa, 2020). De tales microorganismos, se estima que alrededor de 10^{14} organismos pertenecen al dominio de las bacterias siendo diez veces más numeroso que el número total de células somáticas y germinales dentro del cuerpo humano (Gomaa, 2020; Monira et al., 2011). Aproximadamente entre 400 a 500 especies de bacterias, pertenecientes a 190 géneros distintos son albergados en el colon y poseen roles metabólicos importantes (Ramakrishna, 2007). De aquellos, se ha reportado que la gran mayoría de bacterias que habitan el intestino humano es dominado por los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, seguidos por *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Tenericutes*, *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia* que constituyen hasta el 90% de la población total de bacterias intestinales (Jethwani & Grover, 2019).

La configuración de la microbiota intestinal tiene su génesis incluso desde antes del nacimiento, siendo influenciada por una variedad de factores durante el periodo neonatal tales como la salud materna, el estado nutricional de la madre, el método de parto, la dieta y la ubicación geográfica. Los estudios han demostrado que una microbiota intestinal saludable es un factor esencial para la salud humana, ya que desempeña un amplio espectro de funciones protectoras, estructurales y metabólicas que impactan directa o indirectamente en la nutrición e inmunidad del hospedero (Faith et al., 2013; Fan & Pedersen, 2020). Entre algunas de las funciones de relevancia fisiológica de la microbiota intestinal humano, se encuentra la producción de ácidos grasos de cadena corta que sirven de nutrientes para las células epiteliales del colon, producción de vitaminas esenciales (B₃, B₅, B₆, B₁₂, biotina, tetrahidrofolato y vitamina K), mejoramiento de la integridad de la barrera epitelial y el desplazamiento de patógenos por competencia de colonización (Fan & Pedersen, 2020; Kau et al., 2011; O'Hara & Shanahan, 2006; Rakoff-Nahoum et al., 2004). Además, las bacterias comensales también contribuyen en la absorción de nutrientes provenientes de la ingesta dietética, al inducir genes específicos del hospedero para su absorción y modular los índices metabólicos sistémicos de lípidos y glucosa, así como el tiempo de tránsito gastrointestinal mediante la estimulación y respuesta a un amplio rango de neurotransmisores (Evans et al., 2013).

Tomando en consideración la importancia y los diferentes roles que tiene la microbiota intestinal en los procesos fisiológicos de su hospedero, es de esperar que su composición esté asociado a la salud y enfermedad. Debido a la naturaleza dinámica de la abundancia de las diferentes poblaciones de microorganismos en el intestino en respuesta a diversos factores, se postula que la microbiota puede encontrarse en un estado de “eubiosis” o “disbiosis”, siendo el primero un balance entre las especies que habitan el intestino, lo cual se asocia a salud, mientras que la disbiosis se presenta como una perturbación de la eubiosis que se asocia a enfermedades infecciosas y no infecciosas (Al-Rashidi, 2021).

Diversos estudios han observado que la disbiosis intestinal puede incidir en el desarrollo de varias patologías que van desde metabólicas hasta neurodegenerativas, tales como cáncer, intestino irritable, esteatosis hepática no alcohólica, hipertensión, aterosclerosis, entre otras (Chen et al., 2021). Además de estar relacionado con la salud de varios sistemas del cuerpo humano, la microbiota intestinal también ha sido relacionado con el estado nutricional (Zoghi et al., 2024a).

La malnutrición es un desequilibrio en la absorción o ingesta de nutrientes en el cuerpo, que puede surgir debido a un déficit o exceso de nutrientes. En el contexto pediátrico, la malnutrición se presenta como un problema de escala global y es ocasionada por patrones de ingesta de alimentos inadecuados durante los primeros años de vida del niño. Esta condición se manifiesta clínicamente al tener incidencia negativa en las características antropométricas, particularmente el peso, talla, e índice de masa corporal del niño malnutrido en comparación con sus pares del mismo sexo (Zoghi et al., 2024b).

Cuando la malnutrición tiene su origen en la falta o déficit del consumo de nutrientes para cumplir con las necesidades basales del niño, se la denomina desnutrición; esta a su vez se subcategoriza dependiendo de la duración de dicho déficit. La deficiencia nutricional prolongada se asocia con el retraso del crecimiento, conocida como desnutrición crónica infantil, mientras que en períodos relativamente cortos puede manifestarse como emaciación, es decir, una insuficiencia de peso en relación con la talla. Cabe recalcar que la gravedad de la desnutrición aguda puede observarse clínicamente como marasmo, kwashiorkor, o kwashiorkor marasmático los cuales representan las formas más severas de desnutrición (Zoghi et al., 2024b).

Tal como se ha expuesto anteriormente, la microbiota intestinal está estrechamente relacionada con la salud humana, siendo modulada negativamente cuando el individuo atraviesa por una enfermedad y la malnutrición no es la excepción. El intestino de niños desnutridos posee menor diversidad, menor abundancia de bacterias productoras de butirato y menor abundancia de

bacterias probióticas en comparación con sus contrapartes sanas (Balasubramaniam et al., 2021b).

Se ha observado un aumento de *Enterobacteriaceae*, del filo *Proteobacteria*, en niños desnutridos lo cual es asociado a una alteración en la absorción de nutrientes y en la protección intestinal contra patógenos (Gatya et al., 2022). En un estudio realizado en la India se evidenció que el intestino de un niño sano tiene mayor abundancia, a nivel de familia, de las bacterias *Campylobacteraceae*, *Helicobacteraceae*, *Bacteroidaceae* y *Porphyromonadaceae*, mientras que el intestino de un niño desnutrido contiene mayor abundancia de *Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Methanosarcinaceae*, *Thermotogaceae*, *Shewanellaceae* y *Eubacteriaceae* (Gupta et al., 2011). Se ha hallado mayor abundancia de los taxones *Escherichia*, *Klebsiella*, y *Proteobacteria*, pero *Bacteroidetes* en menor abundancia en niños desnutridos de Bangladesh (Monira et al., 2011). En niños africanos y asiáticos desnutridos se encontró que los taxones *Ruminococcaceae*, (*Erysipelotrichaceae*), *Actinobacteria* (*Eggerthella*, *Coriobacteriaceae*) *Firmicutes* (*Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae*), *Bacteroidetes* (*Bacteroidaceae*) se hallaban en menor abundancia que los controles sanos mientras que *Enterococcus fecalis*, *E. coli*, y *Staphylococcus aureus* fueron más abundantes (Million et al., 2016).

Se ha postulado que la diferencia en la microbiota intestinal, cuando es dominada por bacterias patógenas, reduce la inmunidad del hospedero al aumentar la propensión hacia enfermedades inflamatorias mediante un riesgo aumentado de desarrollar intestino permeable. Al mismo tiempo, el intestino permeable predispone al niño a enfermedades infecciosas recurrentes debido a la atrofia en las microvellosidades intestinales y anorexia, que en última instancia resultan en un crecimiento infantil deteriorado. Por lo tanto, la disbiosis intestinal puede conspirar junto con una dieta deficiente para causar desnutrición (Balasubramaniam et al., 2021b; Gatya et al., 2022).

Capítulo 2

2. Metodología.

Diseño de la investigación

El estudio fue de carácter observacional del tipo transversal, ya que se realizaron las observaciones en un solo punto determinado.

Ética en la investigación

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Luis Vernaza con el código Nro. HLV-CEISH-2021-035 (Apéndice A). Además, se obtuvo el consentimiento informado (Apéndice B) firmado por los padres o tutores legales de los niños participantes previo al inicio del estudio. Todos los datos recopilados fueron anonimizados para proteger la identidad del participante.

Población de estudio

Monte Sinaí es una zona marginal de amplia y creciente densidad poblacional y es considerada una de las áreas más pobres, marginales e inseguras de la ciudad de Guayaquil (Ministerio de Transporte y Obras Públicas del Ecuador, 2019). Adicionalmente, carecen de servicios básicos como agua potable y alcantarillado. Esta población fue seleccionada para el presente estudio debido a que la malnutrición infantil se encuentra generalmente en mayor prevalencia en comunidades marginales y de escasos recursos (UNICEF, 2019b). Además, proyectos de servicio comunitario realizados en años anteriores por miembros de la universidad permitieron al investigador el acercamiento a esta población. El estudio fue conducido en Monte Sinaí, sector de la Perimetral al Noroeste de la ciudad de Guayaquil, parroquia Tarqui popular, en las áreas conocidas por sus habitantes como “El Águila” y “El Triángulo”. De forma específica, se contactaron a las madres con niños ≤ 5 años que formaban parte del comedor comunitario “Dios Provee”, el contacto se consiguió mediante la líder comunitaria de dicho sector quien consintió el acercamiento y acceso a la comunidad.

Muestreo

Debido a la dificultad de acceso e inseguridad del área de estudio, se procedió a realizar un muestreo no probablistico por conveniencia basado en criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión:

- Habitante del sector Monte Sinaí
- Edad ≤ 5 años
- Firma de consentimiento informado por parte de padre, madre o cuidador

Criterios de exclusión:

- Infantes que tengan como residencia principal algún sector fuera de Monte Sinaí
- Infantes que presenten diarrea, vómitos, fiebre, anorexia, neumonía o estado de consciencia alterado
- Infantes con malnutrición secundaria (historia de enfermedad cardiaca, hepática, renal, cáncer y enfermedad inflamatoria intestinal)
- Infantes mayores a 6 años

Luego de la firma del consentimiento informado, se le asignó un código al participante y se procedió a realizar la evaluación nutricional y la recolección de muestra de sangre. En el caso de las muestras de heces, estas fueron recolectadas en el transcurso de la misma semana.

Evaluación del estado nutricional

La evaluación nutricional es un proceso sistemático utilizado para evaluar el estado nutricional de un individuo. Involucra la recopilación e interpretación de datos de diversas fuentes que incluyen mediciones antropométricas, pruebas bioquímicas, exámenes clínicos, evaluaciones dietéticas e historia clínica del individuo (Academy of Nutrition and Dietetics, 2025). Tomando en consideración el concepto anterior, se procedió a evaluar a los infantes según indicadores antropométricos, signos clínicos y parámetros bioquímicos (Apéndice C). A

continuación, se detalla los criterios utilizados para cada uno de tales componentes así como para el diagnóstico nutricional que se utilizó en el presente estudio.

Mediciones antropométricas y puntuación Z (z-score)

La elección del protocolo e instrumento de medición dependió de la edad del infante evaluado, siguiendo los protocolos estandarizados del Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Si el infante era menor de 2 años (hasta 1 año 11 meses 29 días), se midió el peso y la estatura en posición decúbito supino. Para aquellos niños de 2 años en adelante, se midió peso y talla en bipedestación (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2012). En el caso de la medición en posición decúbito supino se utilizó la balanza pediátrica marca TANITA modelo BD-815U y el infantómetro marca SECA modelo HR-100. Por otro lado, las mediciones en bipedestación fueron realizadas utilizando la balanza mecánica marca SECA modelo 760 y el tallímetro portátil marca SECA modelo 213.

Se utilizó la edad cronológica del infante para obtener la puntuación Z e interpretar los indicadores antropométricos peso para la edad, talla para la edad, índice de masa corporal para la edad, según las diferentes curvas de crecimiento de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2008).

Signos clínicos

Un signo clínico es un hallazgo que se encuentra durante la exploración física del individuo y puede indicar que este padezca de alguna enfermedad o condición (National Cancer Institute, 2025). En el caso de la malnutrición infantil, esta puede manifestarse en distintas partes del cuerpo y pueden ser halladas mediante una exploración física orientada a la nutrición que involucre las técnicas de observación y palpación (Mahan et al., 2013). En el presente estudio se utilizó una ficha de exploración física que valoró la integridad, estado de hidratación y coloración del cabello, dientes, encías, labios, lengua, mucosas, ojos, piel, abdomen y uñas de los

infantes. La evaluación se realizó según la presencia o ausencia de los signos clínicos descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. *Signos clínicos de malnutrición considerados en la exploración física orientada a la nutrición.*

| Criterio | Hallazgos anormales |
|-----------------------|--|
| Estado de hidratación | Signo del pliegue Retardo llenado capilar Palidez ungueal, de piel y mucosas Ojos hundidos Edema Anasarca Llanto sin lágrimas |
| Masa muscular | Pérdida de masa muscular |
| Panículo adiposo | Pérdida de panículo adiposo periorbitario, glúteos, maseterino, temporal extremidades |
| Piel y faneras | Laxitud Palidez Cianosis Coloración amarilla Dermatitis Hiperqueratosis folicular Hematomas Estrías transversales en uñas Alopecia Cabello seco Signo de la bandera Coiloniquia |
| Ojos | Ceguera nocturna Sequedad Mancha de Bitot Palidez conjuntival |
| Nariz | Rinorrea Aleteo nasal |
| Cavidad oral | Estomatitis angular Queilosis Glositis Retardo en dentición Alteración esmalte dentario Disgeusia Encías sangrantes |
| Cuello | Adenopatías |

| | |
|------------------------|--|
| | Tiroides agrandada Parótida agrandada |
| Tórax | Rosario costal Costillas visibles Tiraje intercostal |
| Abdomen | Globuloso o excavado |
| Extremidades | Edema Pérdida panículo adiposo Extremidades frías |
| Sistema Cardiovascular | Taquicardia |
| Sistema Nervioso | Irritabilidad Adinamia Apatía |
| Aparato digestivo | Hepatomegalia Diarrea Prurito anal |

Parámetros bioquímicos

Se realizó un hemograma completo a los participantes del estudio. El servicio de recolección de las muestras de sangre y su respectivo procesamiento fue realizado por profesionales de un laboratorio clínico al que se contrató. Los resultados de los exámenes séricos de los participantes fueron compartidos por el laboratorio clínico hacia los investigadores principales del presente estudio. La interpretación del hemograma fue realizada utilizando valores referenciales pediátricos internacionales según edad, tal como se aprecia en la Tabla 2.

Tabla 2. *Criterios de interpretación de hemograma según edad*

| Edad | Hb (g/dl) | VCM (fl) | HCM (pg) | CHCM (g/dl) | RDW/ADE (%) | Tipo de anemia |
|--------------|-------------|----------|----------|-------------|-------------|----------------|
| 1 a 23 meses | 10.5 – 14 | 82 – 92 | 27- 31 | 32 – 36 | 11.5 – 14.5 | Normal |
| 2 a 9 años | 11.5 – 14.5 | | | | | |
| | 11.5 – 14.5 | 82 – 92 | 25 - 30 | 32 - 36 | 11.5 – 14.5 | Normocítica |
| | 11.5 – 14.5 | 95 – 150 | 30 – 50 | 32 - 36 | >14.5 | Macroscítica |
| | 11.5 – 14.5 | 50-80 | 12- 25 | 25 -30 | >14.5 | Microscítica |

Nota. Hemoglobina (Hb), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), ancho de distribución de glóbulos rojos/amplitud de distribución eritrocitaria (RDW/ADE).

Diagnóstico nutricional

El diagnóstico nutricional se realizó tomando en consideración los indicadores antropométricos, signos clínicos y parámetros bioquímicos detallados anteriormente siguiendo los siguientes criterio:

Sin riesgo de malnutrición:

- Z-scores de indicadores de crecimiento adecuados para la edad (incluyendo indicador talla para la edad en categoría de alta talla) sin ninguna otra alteración en parámetro bioquímico o clínico.
- Z-scores de indicadores de crecimiento en alerta de bajo peso o bajo peso (peso para la edad e IMC para la edad) o alerta baja talla o baja talla (talla para la edad), sin ninguna otra alteración en parámetro bioquímico o clínico.

Riesgo de malnutrición:

- Z-scores de indicadores de crecimiento en alerta de bajo peso o bajo peso (peso para la edad e IMC para la edad) o alerta baja talla o baja talla (talla para la edad), más alteración en parámetro bioquímico o clínico.
- Indicadores de crecimiento infantil adecuados + signo clínico de desequilibrio nutricional de la exploración física y funcional ó parámetro bioquímico alterado (fuera del rango óptimo para el grupo etario).
- Identificación de al menos un signo clínico de desequilibrio nutricional + al menos un parámetro bioquímico alterado.
- Indicadores de crecimiento adecuados + parámetros bioquímicos sin alteración + ausencia de manifestaciones clínicas e identificación de una práctica de

alimentación infantil importante deficiente (no lactancia materna a libre demanda, no lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses de edad corregida, edad de introducción de alimentación complementaria antes de los 6 meses).

Malnutrición:

- Z-scores de indicadores de crecimiento en categoría bajo peso o muy bajo peso, para peso para la edad e IMC para la edad y, baja talla para la edad + un parámetro bioquímico alterado o un signo clínico de desequilibrio nutricional.
- Z-scores de indicador de crecimiento en categoría alto peso o muy alto peso, en indicadores peso para la edad e IMC para la edad con o sin indicador de crecimiento en categoría de alta talla para la edad.

Extracción de ADN de muestras de heces

Las muestras de heces fueron provistas por los padres o tutores legales de los participantes durante el transcurso de la semana en que se realizó la evaluación nutricional. Los padres o tutores legales recibieron previamente recolectores de heces estériles y se les dio indicaciones específicas sobre cómo recolectar y almacenar las muestras hasta su momento de entrega, a saber: (1) lavarse las manos con agua y jabón antes de recolectar la muestra, (2) utilizar una bacinilla limpia y seca, (3) evitar que las heces se mezclen con orina, (4) recolectar muestra de diferentes áreas de las heces utilizando la espátula estéril hasta llenar el contenedor, (5) cerrar la tapa del contenedor y envolverlo en una funda plástica limpia y sellada, (6) almacenar en el congelador (-20 °C) hasta el día de entrega de muestra, (7) lavarse las manos con agua y jabón luego de recolectar la muestra. Todas las muestras fueron entregadas al equipo de investigación a la mañana siguiente de haber sido recolectadas. Se mantuvo la cadena de frío de las muestras utilizando hieleras con gel packs durante su transporte hasta llegar al laboratorio.

Se realizó la extracción de ADN de tres alícuotas de cada muestra de heces siguiendo el protocolo de extracción del kit “FastDNATM SPIN Kit for Feces” de la marca MP Biomedicals (USA), a saber: primero se descongeló la muestra, se pesaron 500 mg de cada muestra en una balanza marca OHAUS modelo SP202 y se colocaron en un tubo de matriz de lisis E de 2 ml el cual contenía esferas de cerámica de 1.4 mm, esferas de sílice de 0.1 mm y una esfera de vidrio de 4 mm. Luego se agregaron 825 µl de fosfato de sodio y 275 µl de solución PLS del kit FastDNA® SPIN para heces. Inmediatamente, los tubos con contenido fecal, matriz de lisis E, fosfato de sodio y solución PLS se agitaron en vortex durante 15 segundos, luego se centrifugaron a 11,400 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. A continuación, se agregaron 978 µl de buffer de fosfato de sodio y 122 µl de buffer MT a los tubos y se agitaron en vortex brevemente. La mezcla se homogenizó utilizando vortex durante 40 segundos. Finalmente, el lisado se centrifugó a 11,400 rpm durante 5 minutos, y el ADN se extrajo del sobrenadante.

Luego de la extracción, se realizó un proceso adicional de precipitación en frío de ADN en etanol para mejorar la calidad del ADN, por lo tanto, se adicionó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol frío al 100% a cada muestra y se mezcló en vortex. Luego se realizó la precipitación a -20°C durante 12 horas. En la mañana siguiente, se centrifugaron las muestras a 13000rpm a 4°C durante 45 minutos, luego se lavó dos veces el pellet con 0.5ml de etanol frío al 75% durante 10 minutos a 4°C. Se realizó una centrifugación adicional de 10 segundos a máxima velocidad para remover cualquier traza de etanol. Finalmente, se secaron los tubos al aire, se suspendió el ADN en agua libre de nucleasas grado molecular y se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 de la marca Thermo Fisher Scientific previo a su almacenamiento a -20°C.

Amplificación y secuenciación de ADN

El ADN de las muestras fue enviado a Quito a la empresa contratada para la amplificación y secuenciación en una gradilla con tubos rotulados y codificados manteniendo la cadena de frío mediante hielo seco. Se amplificó la región V3-V4 del gen 16S rRNA utilizando los primers 341F: CCTACGGGNGGCWGCAG y 805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC. Se realizaron dos amplificaciones en total. En la primera amplificación se realizó un lavado con perlas magnéticas para purificar el amplicón 16S V3-V4 de primers libres o dímeros de primers. En la segunda amplificación se realizó una Index PCR, adicionando secuencias únicas (índices) en cada extremo de los amplicones de una misma muestra para poder diferenciarlos de otras, lo cual permite secuenciar múltiples muestras en paralelo y obtener datos independientes para cada una. Posteriormente se realizó nuevamente un lavado con perlas magnéticas. Finalmente, se midió la cantidad y calidad de las librerías purificadas antes de ser secuenciadas. La secuenciación se realizó siguiendo el método de metagenómica por amplicones utilizando el equipo MiSeq System de la marca Illumina (Illumina, 2013).

Procesamiento bioinformático

Los archivos FASTQ demultiplexados se descargaron desde BaseSpace Illumina y se subieron al clúster de computación de alto rendimiento en la Universidad de Florida, HiPerGator. Los datos se importaron a QIIME2 (Bolyen et al., 2019). Las lecturas forward se truncaron a 250 pares de bases y las lecturas reverse a 246 pares de bases. Los primers se removieron del inicio de las lecturas. La remoción del ruido se realizó utilizando el pipeline DADA2 (Bokulich et al., 2018; Bolyen et al., 2019; Callahan et al., 2016; McKinney, 2010; Pedregosa et al., 2011). La taxonomía se asignó utilizando el clasificador naïve Bayesian preentrenado de longitud completa de Greengenes2 (McDonald et al., 2023).

Análisis estadístico de microbioma

Después de la eliminación del ruido y clasificación taxonómica de las secuencias, todos los datos fueron exportados desde QIIME2 para ser analizados en R versión 4.3.1(The R Core Team, 2023) utilizando el paquete "vegan"(Oksanen et al., 2022). La alfa diversidad se analizó utilizando el índice de Shannon, calculado después una sola rarefacción a una profundidad según el número más bajo de lecturas obtenido en las muestras. Las diferencias en la alfa diversidad entre infantes en riesgo y no en riesgo de malnutrición se probaron utilizando una prueba t. La beta diversidad se analizó utilizando PERMANOVA, implementada en la función `adonis2` basada en la distancia robusta de Aitchison en el conjunto de datos sin rarefacción, tal como se implementa en la función `vegdist` (Martino et al., 2019), después de probar diferencias en la beta-dispersión utilizando ANOVA. La diversidad beta se visualizó utilizando un análisis de componentes principales (ACP). ANCOM-BC a nivel de familia y género se utilizó para probar diferencias de abundancia diferencial por estado nutricional utilizando los datos sin rarefacción con una corrección de FDR para comparaciones múltiples (Lin & Peddada, 2020).

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

Características de los sujetos de estudio

Un total de 18 infantes fueron incluidos en el estudio y fueron divididos en dos grupos con base en su diagnóstico nutricional: “sin riesgo de malnutrición” (SM, n = 6) y “malnutrición o en riesgo” (RM, n = 12) según lo descrito en la sección de métodos. Cabe recalcar, que solo un infante cumplió con el criterio de malnutrición, por lo tanto, se decidió incluirlo dentro del grupo de malnutrición o en riesgo. De aquellos 18 se formó un subgrupo de estudio de 11 infantes según la presencia (A, n = 4) o ausencia (SA, n = 7) de anemia. El número de dicho subgrupo fue menor al del diagnóstico nutricional puesto que no se pudo obtener la muestra de sangre de siete participantes. Las características de los participantes del estudio se muestran en la Tabla 3 y Tabla 4.

Tabla 3. *Características de la población según diagnóstico nutricional*

| | SM (n = 6) | RM (n = 12) |
|------------------|---------------|---------------|
| Edad (años) | 4.71 ± 1.07 | 4.07 ± 1.16 |
| (rango) | (2.75 – 5.75) | (2.25 – 5.41) |
| Sexo (M/F) | 1/5 | 4/8 |
| Altura (cm) | 103.0 ± 8.58 | 99.5 ± 10.2 |
| Peso (kg) | 15.8 ± 2.78 | 15.9 ± 3.63 |
| Peso (Z-score) | -0.74 ± 0.79 | -0.08 ± 0.75 |
| Altura (Z-score) | -0.81 ± 0.78 | -0.47 ± 0.88 |
| IMC (Z-score) | -0.39 ± 1.11 | 0.31 ± 0.68 |

Nota. Los grupos conformados fueron: sin riesgo de malnutrición (SM), en riesgo de malnutrición (RM). Los valores son presentados como promedio ± desviación estándar.

Tabla 4. Características de la población según estatus de anemia

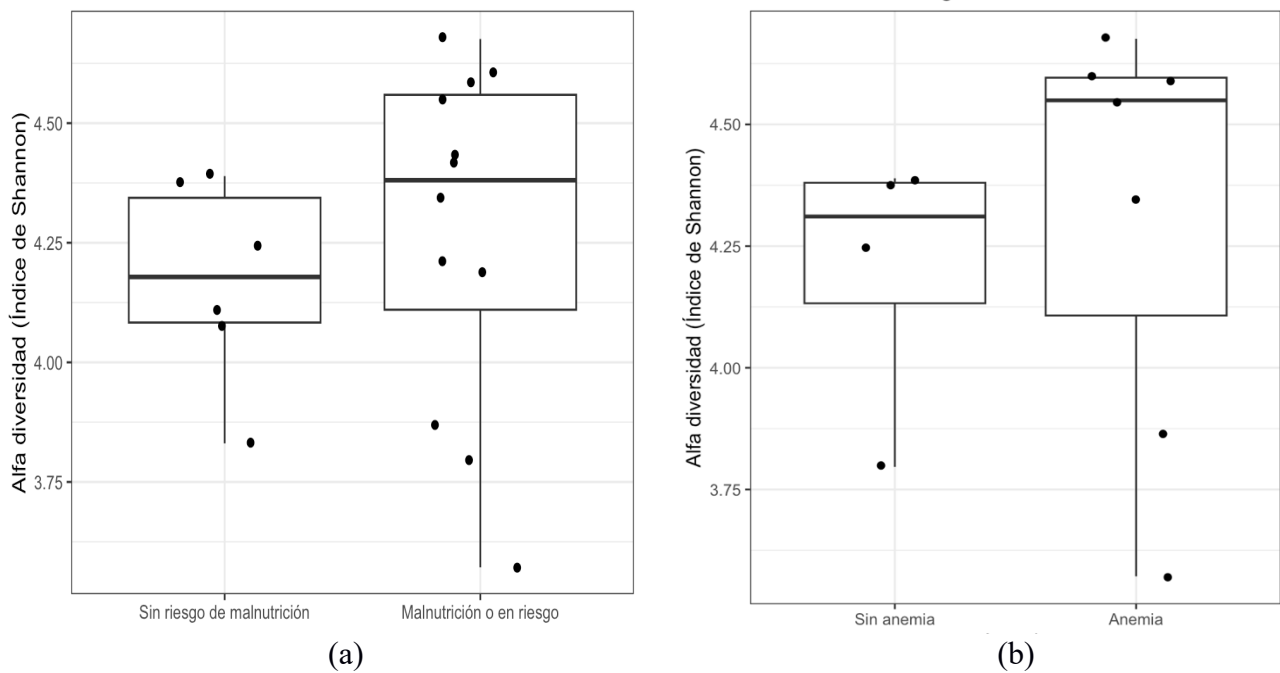
| | SA (n = 4) | A (n = 7) |
|------------------|---------------|---------------|
| Edad (años) | 5.29 ± 0.48 | 4.39 ± 1.05 |
| (rango) | (4.66 – 5.75) | (2.33 – 5.41) |
| Sexo (M/F) | 0/4 | 2/5 |
| Altura (cm) | 107.0 ± 6.96 | 99.2 ± 11.1 |
| Peso (kg) | 18.0 ± 3.00 | 15.8 ± 3.33 |
| Peso (Z-score) | -0.2 ± 1.03 | -0.34 ± 0.73 |
| Altura (Z-score) | -0.50 ± 0.98 | -0.93 ± 0.89 |
| IMC (Z-score) | 0.15 ± 1.45 | 0.36 ± 0.54 |

Nota. Los grupos conformados fueron: sin anemia (SA) y anemia (A). Los valores son presentados como promedio ± desviación estándar.

Diversidad y composición bacteriana según grupos de estudio

El índice de Shannon, el cual considera la riqueza de las especies y la uniformidad de su abundancia, fue utilizado para medir la alfa diversidad bacteriana de los grupos de estudio. Se obtuvo una media de diversidad de 4.17 ± 0.21 y 4.27 ± 0.35 para el grupo SM y RM, respectivamente, sin diferencias significativas entre sus medias ($p = 0.46$). Se obtuvieron resultados similares en el grupo de estudio según estado de anemia con medias de 4.20 ± 0.27 y 4.31 ± 0.42 sin diferencia significativa entre sus medias ($p = 0.61$) para los grupos SA y A, respectivamente. Los resultados de la alfa diversidad se pueden apreciar en la Figura 1.

Figura 1. Alfa diversidad según los grupos de estudio



Nota. La figura muestra los diagramas de caja y bigote del índice de Shannon según los diferentes grupos de estudio. (a) alfa diversidad según diagnóstico nutricional; (b) alfa diversidad según estatus de anemia.

Investigaciones realizadas en poblaciones similares, particularmente en infantes en un rango de edad entre 2 a 8 años, generalmente reportan que aquellos individuos con algún tipo de malnutrición tienden a presentar menor diversidad que aquellos infantes saludables. Por ejemplo, en la investigación de Vonaesch et al. (2018) realizado en Madagascar y República Centroafricana, los infantes con desnutrición crónica mostraron ligeramente menor diversidad que los infantes sanos, aunque las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$). De forma similar, en Indonesia, Ratnayani et al. (2024) indicaron mayor diversidad en los infantes saludables comparado a los que padecían desnutrición crónica en Jakarta ($p > 0.05$) y Surono et al. (2024) en Nusa Tenggara Oriental (p -ajustado < 0.1). Por último, en un estudio realizado en Dhaka, Bangladesh se observó mayor cantidad de unidades taxonómicas en infantes sanos que

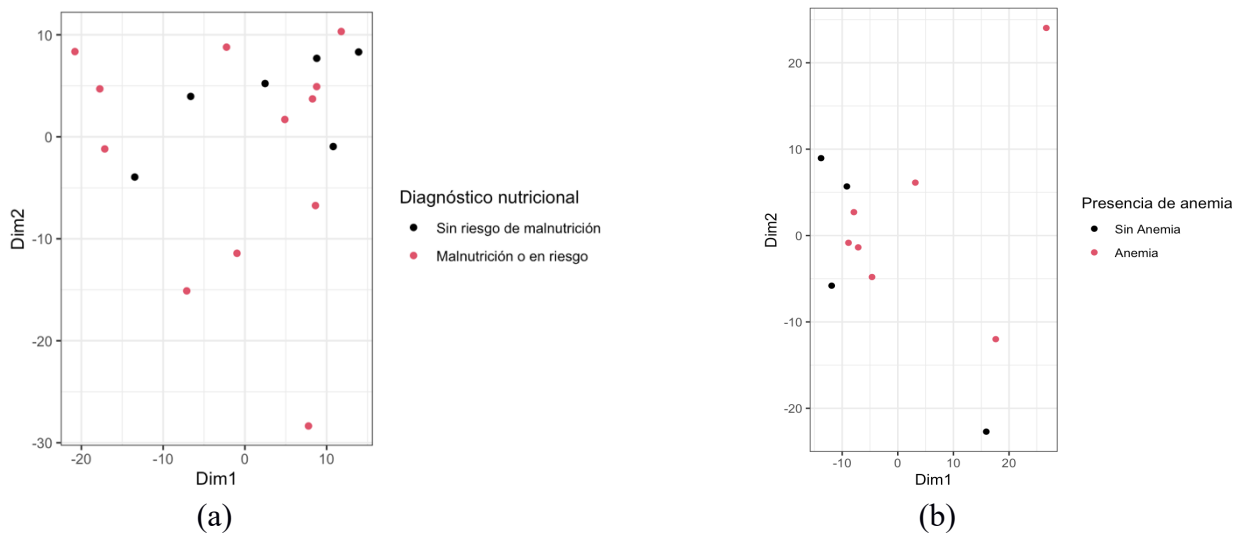
en malnutridos (Monira et al., 2011). Cabe recalcar que no se encontraron investigaciones que tengan como grupos de estudio a individuos que se encuentren *en riesgo* de malnutrición para realizar mejores comparaciones. Los resultados del presente estudio mostraron que los infantes con malnutrición o en riesgo presentaban ligeramente mayor diversidad bacteriana, aunque no significativa ($p = 0.46$), que aquellos sin riesgo, lo cual pudiera indicar un mayor incremento de bacterias patógenas en comparación con sus contrapartes saludables.

Respecto a la anemia y su relación con la microbiota intestinal, estudios han reportaron que la diversidad se ve disminuida de forma significativa en niños que padecen de anemia en comparación con sus contrapartes saludables; Díaz-Rodríguez et al. (2022) observaron menor cantidad de especies observadas ($p < 0.05$) en niños de Perú y Seyoum et al. (2024) reportaron menor uniformidad ($p < 0.05$) en niños de Cambodia, ambos casos en niños menores de 10 años. No obstante, en un estudio realizado en Lituania, no se apreciaron diferencias significativas en una población de niños de entre 7 a 34 meses (Muleviciene et al., 2018). De forma similar a lo observado en el grupo de diagnóstico nutricional, en la presente investigación se observó que los infantes que padecían de anemia tenían ligeramente mayor diversidad que sus contrapartes saludables, aunque dichas diferencias no fueron significativas ($p = 0.61$).

La beta diversidad refleja la variación composicional de la microbiota intestinal entre los grupos de estudio. En la presente investigación se utilizó PERMANOVA, basada en la distancia robusta de Aitchison, para medir la disimilitud entre grupos. El diagnóstico nutricional (sin riesgo de malnutrición y malnutrición o en riesgo) explicó el 5% de la varianza composicional de la microbiota intestinal, aunque no difirió de forma significativa ($R^2 = 0.05$, $p = 0.95$, permutaciones = 999). Además, no se pudo confirmar la homogeneidad de dispersión (ANOVA, $p = 0.01$) para validar la inferencia de los grupos de diagnóstico nutricional. Por otro lado, el estatus de anemia (anemia y no anemia) explicó el 9% de la varianza composicional de la microbiota intestinal, aunque no difirió de forma significativa ($R^2 = 0.09$, $p = 0.88$,

permutaciones = 999). El gráfico biplot del análisis de componentes principales (ACP) se utilizó para visualizar la distancia entre puntos tal como se muestra en la Figura 2.

Figura 2. Biplot ACP según los grupos de estudio



Nota. La figura muestra el gráfico de las dos primeras componentes del análisis de componentes principales según estado nutricional (a) y estatus de anemia (b). Las muestras que se encuentran más cercanas entre sí poseen mayor similitud en su composición bacteriana.

Estudios han reportado resultados contradictorios respecto a la beta diversidad de las comunidades bacterianas en infantes con malnutrición. Algunos reportan diferencias significativas, sugiriendo alteraciones (disbiosis) de forma global de dichas comunidades en asociación con la malnutrición (Monira et al., 2011; Surono et al., 2024), mientras que otros autores no han reportado tales diferencias (Ratnayani et al., 2024; Vonaesch et al., 2018). De forma similar a los resultados de alfa diversidad, no se encontraron investigaciones que tengan como grupos de estudio a individuos que se encuentren *en riesgo* de malnutrición para realizar comparaciones más precisas. Los hallazgos del presente estudio no mostraron diferencias significativas ($p = 0.95$) entre los infantes con malnutrición o en riesgo (RM) comparado con

aquellos sin riesgo de malnutrición (SM), sugiriendo comunidades estructuralmente similares entre infantes en riesgo de malnutrición y sanos.

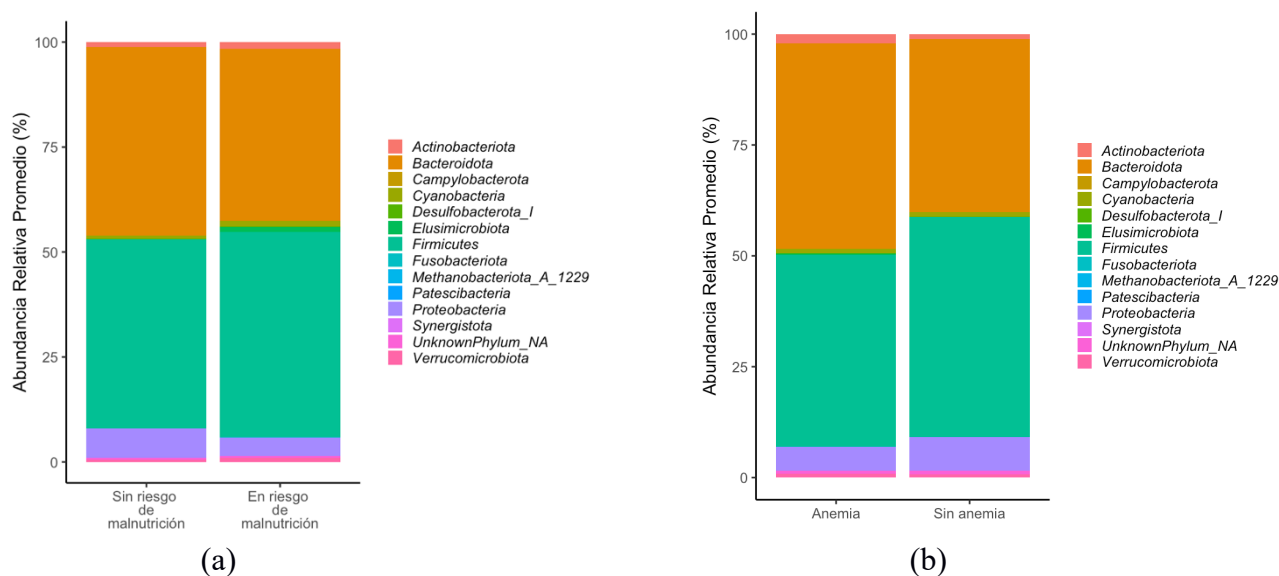
Por otro lado, en referencia a la beta diversidad según estatus de anemia, investigaciones en niños menores a 10 años no han reportado diferencias significativas entre aquellos que padecen anemia en comparación con niños saludables (Díaz-Rodríguez et al., 2022; Seyoum et al., 2024). No obstante, en una población más joven (7 a 34 meses), Muleviciene et al. (2018) encontraron que los infantes anémicos presentaban una composición bacteriana diferente a sus contrapartes saludables ($p < 0.05$). Los hallazgos del presente estudio no evidenciaron diferencias significativas ($p = 0.88$) entre los infantes con anemia comparado con aquellos sin anemia, sugiriendo comunidades estructuralmente similares entre infantes ambos grupos.

Respecto a la composición bacteriana, a nivel taxonómico de filo, se pudieron observar diferencias en las abundancias relativas promedio entre los grupos formados según su diagnóstico nutricional. Los filos *Firmicutes* y *Bacteroidota* fueron los que contaron con mayor abundancia en ambos grupos. *Firmicutes* presentó una mayor abundancia en SM (48.92%) que en RM (45.10%). *Bacteroidota* presentó mayor abundancia en SM (44.96%) que en RM (41.06%). *Proteobacteria* fue más abundante en SM (7.06%) que en RM (4.37%). *Actinobacteriota* fue más abundante en el grupo RM (1.59%) que en el SM (1.15%). *Cyanobacteria* fue menos abundante en SM (0.66%) que en RM (1.27%). *Verrucomicrobiota* fue más abundante en SM (0.58%) que en RM (1.13%). Interesantemente, uno de los cambios porcentuales más pronunciados a nivel de filo se encontró en *Desulfobacterota_I* y *Synergistota*. *Desulfobacterota_I* presentó una abundancia de 0.13% en el grupo SM mientras que 0.5% en el grupo RM. *Synergistota* tuvo una abundancia de 0.01% en SM mientras que en el grupo RM su abundancia fue de 0.13%. La abundancia promedio relativa a nivel de filo de los grupos SM y RM se pueden apreciar en la Figura 3a.

De la misma forma, los grupos formados según su estatus de anemia mostraron diferencias de abundancia relativa promedio en su composición bacteriana. Los filos *Firmicutes*

y *Bacteroidota* fueron los que presentaron mayor abundancia. *Bacteroidota* presentó mayor abundancia en A (46.31%) que en SA (39.06%). *Firmicutes* presentó menor abundancia en A (43.16%) que en SA (49.59%). *Proteobacteria* fue menos abundante en A (5.39%) que en SA (7.61%). *Actinobacteriota* fue más abundante en el grupo A (2.14%) que en el SA (1.13%). *Cyanobacteria* fue menos abundante en A (0.94%) que en SA (0.98%). *Verrucomicrobiota* fue más abundante en A (0.93%) que en SA (0.74%). *Desulfobacterota_I* fue más abundante en SA (0.08%) que en A (0.07%). *Methanobacteriota_A_1229* presentó la misma abundancia en ambos grupos (0.01%). Algunas de las diferencias más destacables se presentaron en los filos *Elusimicrobiota*, *Synergistota*, y *Fusobacteriota*. *Elusimicrobiota* tuvo una abundancia del 0.38% en A, pero no presentó abundancia en SA (0.00%). *Synergistota* no presentó abundancia en A, pero tuvo una abundancia del 0.02% en SA. *Fusobacteriota* fue más abundante en A (0.06%) que en el grupo SA (0.01%). La abundancia promedio relativa a nivel de filo de los grupos A y SA se pueden apreciar en la Figura 3b.

Figura 3. Abundancia relativa bacteriana promedio a nivel de filo de los grupos de estudio



Nota. La figura muestra la abundancia relativa promedio de los filos bacterianos según el diagnóstico nutricional (a) y el estatus de anemia (b).

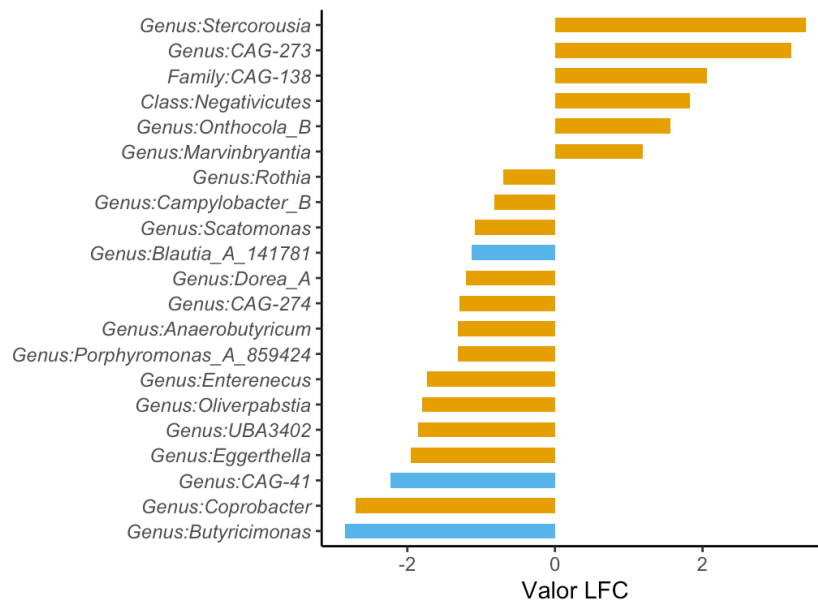
La abundancia diferencial bacteriana de los diferentes grupos de estudio fue investigada de forma exhaustiva realizando un análisis de composición de microbiomas con corrección de sesgo (ANCOM-BC, por sus siglas en inglés). Respecto al grupo de estudio según su diagnóstico nutricional, los taxones *UBA1381*, *Butyricimonas*, *Blautia_A_141781* y *CAG-41* presentaron menor abundancia en el grupo RM que en SM de forma significativa, a distintos niveles de significancia, tomando al grupo SM como referencia. *Blautia* ha tenido reportes contradictorios en la literatura, algunos autores han observado que dicho género se encuentra en mayor abundancia en niños malnutridos (Rinanda et al., 2023) mientras que otros mencionan lo opuesto (Ratnayani et al., 2024). Es relevante destacar que, en un estudio prospectivo en infantes de 6 a 12 meses de edad realizado en Perú, Zambruni et al. (2019) encontraron que el género *Butyricimonas* y *Blautia* incrementaron su abundancia significativamente en infantes con malnutrición crónica y también en sus controles sanos luego de 6 meses, lo cual indicaría que la abundancia de dicho género no estaría relacionada al desarrollo de malnutrición crónica en esa edad, si no que respondería a la diversificación natural de la microbiota intestinal. Es importante recalcar nuevamente que dicho estudio fue realizado en infantes menores de 2 años, el cual se considera un periodo crítico de gran diversificación de la composición microbiana intestinal, mientras que la edad de la población del presente estudio (alrededor de 5 años) es muy parecida a la microbiota de un adulto (Niu et al., 2020), razón por la cual dichos resultados no serían extrapolables a la población estudiada en esta investigación. No se encontraron reportes de *UBA1381*, *CAG-41* publicados en estudios similares al presente. Los taxones, tamaños de efecto y valores p ajustados para este grupo de estudio se pueden apreciar en la Tabla 5. El cambio logarítmico en la abundancia relativa de cada taxón, a nivel de género, según el diagnóstico nutricional se puede apreciar en la Figura 4.

Tabla 5. Resultados de abundancia diferencial según diagnóstico nutricional

| Taxón | RM/SM (LFC) | Valor p-ajustado (FDR) |
|-------------------------|----------------|---------------------------|
| <i>UBA1381</i> | -2.17 | 0.07 ⁺ |
| <i>Butyricimonas</i> | -2.84 | 0.00 ^{**} |
| <i>Blautia_A_141781</i> | -1.13 | 0.08 ⁺ |
| <i>CAG-41</i> | -2.22 | 0.08 ⁺ |

Nota. El análisis de abundancia diferencial de los grupos sin riesgo de malnutrición (SM) y con malnutrición o en riesgo (RM) se realizó mediante ANCOM-BC, utilizando como fórmula '~nut_diag2' sin covariables, donde 'nut_diag2' representaba a los grupos de interés según su diagnóstico nutricional. El grupo SM se utilizó como referencia. La tasa de descubrimiento falso (FDR) fue seleccionada como método de ajuste del valor p. Los niveles de significancia fueron representados con ⁺ (p ajustado < 0.1), ^{*} (p ajustado < 0.05).

Figura 4. Abundancia diferencial según diagnóstico nutricional



Nota. La figura muestra el cambio logarítmico en la abundancia relativa de los diferentes géneros de bacterias, comparando al grupo RM con SM. Se resalta en azul aquellos taxones que fueron significativos (p ajustado < 0.1).

Por otro lado, en el subgrupo de estudio según estatus de anemia, los taxones *Porphyromonadaceae*, *Porphyromonas_A_859424*, *Butyricimonas* y *UMGS1071* presentaron menor abundancia en A que en SA de forma significativa (p ajustado < 0.05) tomando al grupo SA como referencia. No se han reportado cambios de abundancia diferencial de los taxones mencionados anteriormente en la literatura en niños con anemia. Sin embargo, se ha asociado la abundancia de *Ruminococcus*, *Anaerostipes* y *Prevotella* en niños que padecen de anemia nutricional mientras que la abundancia de *Clostridia*, *Lachnospiraceae*, *Faecalibacterium* y *Eubacterium halli* se relacionó a niños sin anemia ($p < 0.05$) (Seyoum et al., 2024). Un metaanálisis publicado recientemente asoció la abundancia de los taxones *Clostridia*, *Actinomycetaceae*, *Pasteurellaceae*, *Oscillospira*, *Prevotella*, y *Roseburia* como factores protectores mientras que la abundancia de *Ruminococcus gnavus*, *Hungatella*, and *Parasutterella* como factores de riesgo para la anemia por deficiencia de hierro (Lei et al., 2025). Los taxones, tamaños de efecto y valores p ajustados para este grupo de estudio se pueden apreciar en la Tabla 6. El cambio logarítmico en la abundancia relativa de cada taxón, a nivel de género, según el estatus de anemia se puede apreciar en la Figura 5.

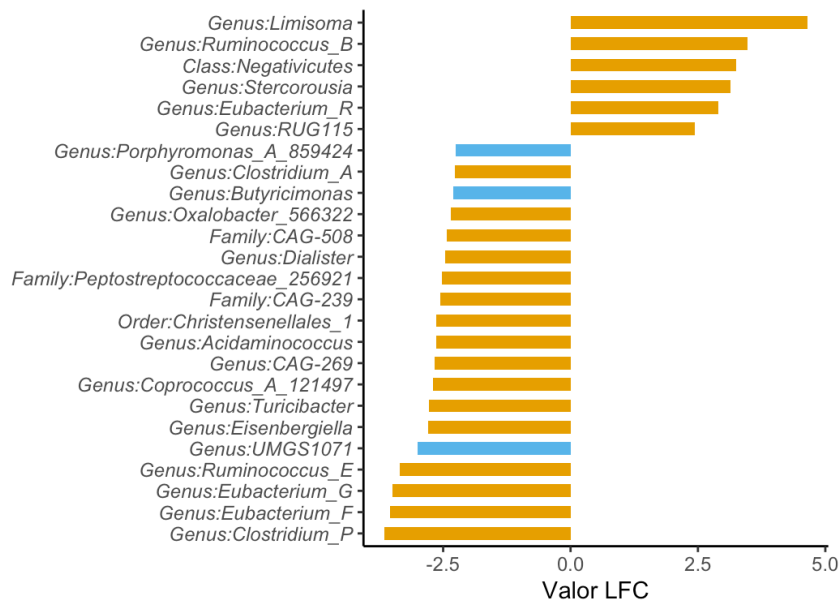
Tabla 6. Resultados de abundancia diferencial según estatus de anemia

| Taxón | A/SA (LFC) | Valor p-ajustado (FDR) |
|-------------------------------|---------------|---------------------------|
| <i>Porphyromonadaceae</i> | -1.93 | 0.01* |
| <i>Porphyromonas_A_859424</i> | -2.25 | 0.00* |
| <i>Butyricimonas</i> | -2.29 | 0.02* |
| <i>UMGS1071</i> | -3.00 | 0.02* |

Nota. El análisis de abundancia diferencial de los grupos sin anemia (SA) y con anemia (A) se realizó mediante ANCOM-BC, utilizando como fórmula '~ anemia' sin covariables, donde 'anemia' representaba a los grupos de interés según su estatus de anemia. El grupo SA se utilizó

como referencia. La tasa de descubrimiento falso (FDR) fue seleccionada como método de ajuste del valor p. El nivel de significancia fue representado con * (p ajustado < 0.05).

Figura 5. Abundancia diferencial según estatus de anemia



Nota. La figura muestra el cambio logarítmico en la abundancia relativa de los diferentes géneros de bacterias, comparando al grupo A con SA. Se resalta en azul aquellos taxones que fueron significativos (p ajustado < 0.05).

Es de particular interés que *Butyricimonas* se encontró muy reducido de forma significativa en ambos grupos de estudio, tanto para el grupo según el diagnóstico nutricional (p ajustado = 0.00) como en estatus de anemia (p ajustado = 0.02). En el caso de los infantes con malnutrición o en riesgo, se evidenció que *Butyricimonas* fue aproximadamente 17 veces menos abundante que en los infantes sin riesgo de malnutrición, mientras que en aquellos con anemia fue aproximadamente 10 veces menos abundante que en sus contrapartes saludables.

Butyricimonas es un género de bacterias anaeróbicas estrictas perteneciente a la familia *Porphyromonadaceae*, la cual también se halló significativamente reducida en el grupo de infantes con anemia, que habitan el intestino, cuyos productos metabólicos finales son

principalmente ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, por sus siglas en inglés) como los ácidos butíricos, isobutíricos e isovaléricos; además, también producen ácido acético, propiónico y succínico (Sakamoto et al., 2009, 2014). Cabe destacar que los SCFAs son metabolitos de gran relevancia producidos por la microbiota intestinal, ejerciendo principalmente sus efectos al mejorar la función de la barrera intestinal, inhibir la respuesta inflamatoria, promover la apoptosis y regular la inmunidad. Los desbalances en los SCFAs se han relacionado a varias enfermedades (Zhang et al., 2023).

Los resultados del presente estudio indican que los infantes que se encuentran en riesgo de malnutrición o con anemia poseen una microbiota intestinal reducida en *Butyricimonas*. Este hallazgo pudiera explicarse ya que dicho género de bacterias desempeña un papel importante en el mantenimiento de la salud intestinal mediante su producción de ácidos grasos de cadena corta que proveen de energía a los colonocitos además de promover un ambiente antiinflamatorio. Su reducción puede llevar a una función intestinal comprometida y a una inflamación crónica lo cual dificulta la absorción de nutrientes y pudiera tener un rol en el desarrollo de malnutrición o anemia.

Capítulo 4

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se pueden obtener las siguientes conclusiones que responden a los objetivos planteados:

1. El riesgo de malnutrición o el estatus de anemia no influyeron de forma significativa en la diversidad (alfa diversidad) o composición global (beta diversidad) de la microbiota intestinal de los infantes en comparación con sus contrapartes saludables. Aunque a nivel global presentaron características similares, se hallaron diferencias significativas en la abundancia diferencial a nivel taxonómico de familia y género.
2. Los infantes con riesgo de malnutrición se caracterizan por tener menor abundancia de *Butyricimonas*, *Blautia_A_141781*, *CAG-41* y *UBA1381* en comparación con sus contrapartes saludables (p ajustado < 0.1). Por otro lado, los infantes que padecen de anemia se caracterizan por tener menor abundancia de *Porphyromonadaceae*, *Porphyromonas_A_859424*, *Butyricimonas* y *UMGS1071* en comparación con sus contrapartes que no padecían anemia (p ajustado < 0.05). La abundancia de *Butyricimonas* se vió reducida en ambos casos (p ajustado < 0.05), dicho género de bacterias es de particular interés puesto que desempeña un papel importante en la salud intestinal mediante su producción de ácidos grasos de cadena corta. Su reducción pudiera derivar a una función intestinal comprometida y a inflamación crónica, lo cual dificulta la absorción de nutrientes y pudiera conducir a malnutrición o anemia.

4.2 Recomendaciones

Luego de culminar lo planificado en la presente investigación, se obtienen las siguientes recomendaciones primordiales:

1. El estudio utilizó un modelo de diagnóstico nutricional integral que involucraba diversos aspectos relevantes de la valoración nutricional que permitía valorar el riesgo de malnutrición incluso antes de que esta se establezca; no obstante, no se obtuvieron suficientes participantes que cumplieran con los criterios de malnutrición (solo un participante cumplió) para poder realizar las comparaciones entre las tres categorías, a saber: “sin riesgo de malnutrición”, “riesgo de malnutrición” y “malnutrición”, por lo cual los análisis se basaron en las categorías “sin riesgo de malnutrición” y “malnutrición o en riesgo”. Debido a las limitaciones de acceso a la población de estudio no se pudieron reclutar a más participantes. Por lo tanto, se recomienda que futuras investigaciones en poblaciones similares utilicen el mismo modelo de diagnóstico, que va más allá de las z-scores, y consigan grupos de al menos 20 participantes en cada grupo para comprender mejor la relación de la microbiota intestinal y el diagnóstico nutricional.
2. Con base a los hallazgos, se recomienda que futuras investigaciones también incluyan análisis de ácidos grasos de cadena corta en los sujetos de estudio para establecer conclusiones más robustas. A pesar de que se encontró que *Butyricimonas* se encontraba significativamente disminuida en los grupos (RM y A), y que dicha relación pudiera explicarse mediante una menor producción de SCFAs a nivel intestinal, esto no fue medido directamente en el presente estudio. Por lo que sería pertinente también cuantificar el contenido fecal de SCFAs en futuros estudios.

Referencias

- Academy of Nutrition and Dietetics. (2025). *Nutrition Assessment*.
<https://www.eatrightpro.org/practice/nutrition-care-process/ncp-overview/nutrition-assessment>
- Al-Rashidi, H. E. (2021). Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1628.
<https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.10.068>
- Baek, C., Kim, W. J., Moon, J. W., Moon, S. Y., Kim, W., Hu, H. J., & Min, J. (2022). Differences in the gut microbiome composition of Korean children and adult samples based on different DNA isolation kits. *PloS One*, 17(3).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0264291>
- Balasubramaniam, C., Mallappa, R. H., Singh, D. K., Chaudhary, P., Bharti, B., Muniyappa, S. K., & Grover, S. (2021a). Gut bacterial profile in Indian children of varying nutritional status: a comparative pilot study. *European Journal of Nutrition*, 60(7), 3971–3985.
<https://doi.org/10.1007/S00394-021-02571-7/FIGURES/6>
- Balasubramaniam, C., Mallappa, R. H., Singh, D. K., Chaudhary, P., Bharti, B., Muniyappa, S. K., & Grover, S. (2021b). Gut bacterial profile in Indian children of varying nutritional status: a comparative pilot study. *European Journal of Nutrition*, 60(7), 3971–3985.
<https://doi.org/10.1007/S00394-021-02571-7>
- Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1).
<https://doi.org/10.1186/S40168-018-0470-Z>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 2019 37:8, 37(8), 852–857.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 2016 13:7, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- Chen, Y., Zhou, J., & Wang, L. (2021). Role and Mechanism of Gut Microbiota in Human Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 625913.
<https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.625913/FULL>
- Chew, C., Barros, K. V., Weffort, V. R. S., Maranhão, H. de S., Laranjeira, M., Knol, J., Roeselers, G., & de Morais, M. B. (2020). Gut Microbiota of Young Children Living in Four Brazilian Cities. *Frontiers in Pediatrics*, *8*, 573815.
<https://doi.org/10.3389/FPED.2020.573815/FULL>
- Díaz-Rodríguez, K., Pacheco-Aranibar, J., Manrique-Sam, C., Ita-Balta, Y., Carpio-Toia, A. M. del, López-Casaperalta, P., Chocano-Rosas, T., Fernandez-F, F., Villanueva-Salas, J., & Bernabe-Ortiz, J. C. (2022). Intestinal Microbiota in Children with Anemia in Southern Peru through Next-Generation Sequencing Technology. *Children*, *9*(11), 1615.
<https://doi.org/10.3390/CHILDREN9111615/S1>
- Evans, J. M., Morris, L. S., & Marchesi, J. R. (2013). The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *The Journal of Endocrinology*, *218*(3).
<https://doi.org/10.1530/JOE-13-0131>
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C., Leibel, R. L., Rosenbaum, M., & Gordon, J. I. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6141). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1237439>
- Fan, Y., & Pedersen, O. (2020). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology* *2020 19:1*, *19*(1), 55–71. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- Gatya, M., Fibri, D. L. N., Utami, T., Suroto, D. A., & Rahayu, E. S. (2022). Gut Microbiota Composition in Undernourished Children Associated with Diet and Sociodemographic Factors: A Case–Control Study in Indonesia. *Microorganisms*, *10*(9), 1748.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10091748/S1>
- Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, *113*(12), 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/S10482-020-01474-7>
- Gupta, S., Mohammed, M., Ghosh, T., Kanungo, S., Nair, G., & Mande, S. S. (2011). Metagenome of the gut of a malnourished child. *Gut Pathogens*, *3*(1), 7.
<https://doi.org/10.1186/1757-4749-3-7>
- Herrera, M., Castellanos, J., Obregón, G., Pilaguano, M., & Guevara, V. (2024). *Boletín Técnico Nro. 02-2024 - ENDI. Principales Indicadores.*

- Illumina. (2013). *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System*.
- Jethwani, P., & Grover, K. (2019). Gut Microbiota in Health and Diseases – A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(08), 1586–1599. <https://doi.org/10.20546/IJCMAS.2019.808.187>
- Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L., & Gordon, J. I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome, and immune system: envisioning the future. *Nature*, 474(7351), 327. <https://doi.org/10.1038/NATURE10213>
- Lin, H., & Peddada, S. Das. (2020). Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7>
- Mahan, K., Escott-Stump, S., & Raymond, J. (2013). *Krause Dietoterapia* (13th ed.). Elsevier.
- Martino, C., Morton, J. T., Marotz, C. A., Thompson, L. R., Tripathi, A., Knight, R., & Zengler, K. (2019). A Novel Sparse Compositional Technique Reveals Microbial Perturbations. *MSystems*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00016-19>
- McDonald, D., Jiang, Y., Balaban, M., Cantrell, K., Zhu, Q., Gonzalez, A., Morton, J. T., Nicolaou, G., Parks, D. H., Karst, S. M., Albertsen, M., Hugenholtz, P., DeSantis, T., Song, S. J., Bartko, A., Havulinna, A. S., Jousilahti, P., Cheng, S., Inouye, M., ... Knight, R. (2023). Greengenes2 unifies microbial data in a single reference tree. *Nature Biotechnology* 2023 42:5, 42(5), 715–718. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01845-1>
- McKinney, W. (2010). Data Structures for Statistical Computing in Python. *Scipy*, 56–61. <https://doi.org/10.25080/MAJORA-92BF1922-00A>
- Million, M., Tidjani Alou, M., Khelaifia, S., Bachar, D., Lagier, J. C., Dione, N., Brah, S., Hugon, P., Lombard, V., Armougom, F., Fromont, J., Robert, C., Michelle, C., Diallo, A., Fabre, A., Guieu, R., Sokhna, C., Henrissat, B., Parola, P., & Raoult, D. (2016). RETRACTED ARTICLE: Increased Gut Redox and Depletion of Anaerobic and Methanogenic Prokaryotes in Severe Acute Malnutrition. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep26051>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2012). *Manual de procedimientos de antropometría y determinación de la presión arterial*.
- Ministerio de Transporte y Obras Públicas del Ecuador. (2019). *Informe de viabilidad “Rehabilitación de la vía de acceso al hospital Monte Sináí.”*
- Monira, S., Nakamura, S., Gotoh, K., Izutsu, K., Watanabe, H., Alam, N. H., Endtz, H. P., Cravioto, A., Ali, S. I., Nakaya, T., Horii, T., Iida, T., & Alam, M. (2011). Gut microbiota

- of healthy and malnourished children in bangladesh. *Frontiers in Microbiology*, 2(NOV).
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2011.00228>
- Moran-Ramos, S., Lopez-Contreras, B. E., Villarruel-Vazquez, R., Ocampo-Medina, E., Macias-Kauffer, L., Martinez-Medina, J. N., Villamil-Ramirez, H., León-Mimila, P., Del Rio-Navarro, B. E., Ibarra-Gonzalez, I., Vela-Amieva, M., Gomez-Perez, F. J., Velazquez-Cruz, R., Salmeron, J., Reyes-Castillo, Z., Aguilar-Salinas, C., & Canizales-Quinteros, S. (2020). Environmental and intrinsic factors shaping gut microbiota composition and diversity and its relation to metabolic health in children and early adolescents: A population-based study. *Gut Microbes*, 11(4), 900. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1712985>
- Muleviciene, A., D'Amico, F., Turrone, S., Candela, M., & Jankauskiene, A. (2018). Iron deficiency anemia-related gut microbiota dysbiosis in infants and young children: A pilot study. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 65(4), 551–564.
<https://doi.org/10.1556/030.65.2018.045>
- National Cancer Institute. (2025). *Definition of sign - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI*.
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/sign>
- Niu, J., Xu, L., Qian, Y., Sun, Z., Yu, D., Huang, J., Zhou, X., Wang, Y., Zhang, T., Ren, R., Li, Z., Yu, J., & Gao, X. (2020). Evolution of the Gut Microbiome in Early Childhood: A Cross-Sectional Study of Chinese Children. *Frontiers in Microbiology*, 11, 475213.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00439/BIBTEX>
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7(7), 688. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOR.7400731>
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., ... Weedon, J. (2022). Community Ecology Package [R package vegan version 2.6-8]. *CRAN: Contributed Packages*. <https://doi.org/10.32614/CRAN.PACKAGE.VEGAN>
- Pedregosa, F., Michel, V., Grisel OLIVIERGRISEL, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Vanderplas, J., Cournapeau, D., Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Thirion, B., Grisel, O., Dubourg, V., Passos, A., Brucher, M., Perrot and Édouardand, M., Duchesnay, and Édouard, & Duchesnay EDOUARDDUCHESNAY, Fré. (2011). Scikit-learn: Machine Learning in Python Gaël Varoquaux Bertrand Thirion Vincent Dubourg Alexandre Passos PEDREGOSA, VAROQUAUX, GRAMFORT ET AL. Matthieu Perrot. *Journal of Machine Learning Research*, 12, 2825–2830. <http://scikit-learn.sourceforge.net>

- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, *118*(2), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>
- Ramakrishna, B. S. (2007). The normal bacterial flora of the human intestine and its regulation. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *41*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1097/MCG.0B013E31802FBA68>
- Ratnayani, Hegar, B., Sunardi, D., Fadilah, F., Gunardi, H., Fahmida, U., & Vidiawati, D. (2024). Association of Gut Microbiota Composition with Stunting Incidence in Children under Five in Jakarta Slums. *Nutrients*, *16*(20), 3444. <https://doi.org/10.3390/NU16203444>
- Rinanda, T., Riani, C., Artarini, A., & Sasongko, L. (2023). Correlation between gut microbiota composition, enteric infections and linear growth impairment: a case–control study in childhood stunting in Pidie, Aceh, Indonesia. *Gut Pathogens*, *15*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13099-023-00581-W/FIGURES/3>
- Sakamoto, M., Takagaki, A., Matsumoto, K., Kato, Y., Goto, K., & Benno, Y. (2009). *Butyricimonas synergistica* gen. nov., sp. nov. and *Butyricimonas virosa* sp. nov., butyric acid-producing bacteria in the family “Porphyromonadaceae” isolated from rat faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(7), 1748–1753. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.007674-0/CITE/REFWORKS>
- Sakamoto, M., Tanaka, Y., Benno, Y., & Ohkuma, M. (2014). *Butyricimonas faecihominis* sp. nov. and *Butyricimonas paravirosa* sp. nov., isolated from human faeces, and emended description of the genus *Butyricimonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*(Pt_9), 2992–2997. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.065318-0/CITE/REFWORKS>
- Seyoum, Y., Greffeuille, V., Kouadio, D. K. D., Kuong, K., Turpin, W., M’Rabt, R., Chochois, V., Fortin, S., Perignon, M., Fiorentino, M., Berger, J., Burja, K., Ponce, M. C., Chamnan, C., Wieringa, F. T., & Humblot, C. (2024). Faecal microbiota of schoolchildren is associated with nutritional status and markers of inflammation: a double-blinded cluster-randomized controlled trial using multi-micronutrient fortified rice. *Nature Communications*, *15*(1), 5204. <https://doi.org/10.1038/S41467-024-49093-4>
- Surono, I. S., Popov, I., Verbruggen, S., Verhoeven, J., Kusumo, P. D., & Venema, K. (2024). Gut microbiota differences in stunted and normal-length children aged 36–45 months in East Nusa Tenggara, Indonesia. *PLOS ONE*, *19*(3), e0299349. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0299349>

- The R Core Team. (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
<https://www.gnu.org/copyleft/gpl.html>.
- UNICEF. (2019a). *The State of the World's Children 2019. Children, Food and Nutrition: Growing well in a changing world*.
- UNICEF. (2019b). *The State of the World's Children 2019. Children, Food and Nutrition: Growing well in a changing world*.
- Valencia, P. M., Richard, M., Brock, J., & Boglioli, E. (2017). The human microbiome: Opportunity or hype? *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*(12), 823–824.
<https://doi.org/10.1038/NRD.2017.154>
- Vonaesch, P., Morien, E., Andrianonimiadana, L., Sanke, H., Mbecko, J. R., Huus, K. E., Naharimanananirina, T., Gondje, B. P., Nigatoloum, S. N., Vondo, S. S., Kaleb Kandou, J. E., Randremanana, R., Rakotondrainipiana, M., Mazel, F., Djorie, S. G., Gody, J. C., Finlay, B. B., Rubbo, P. A., Parfrey, L. W., ... Sansonetti, P. J. (2018). Stunted childhood growth is associated with decompartmentalization of the gastrointestinal tract and overgrowth of oropharyngeal taxa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(36), E8489–E8498.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1806573115/-/DCSUPPLEMENTAL>
- World Health Organization. (2008). *Training Course on Child Growth Assessment*. World Health Organization.
- Zambruni, M., Ochoa, T. J., Somasunderam, A., Cabada, M. M., Morales, M. L., Mitreva, M., Rosa, B. A., Acosta, G. J., Vigo, N. I., Riveros, M., Arango, S., Durand, D., Berends, M. N., Melby, P., & Utay, N. S. (2019). Stunting Is Preceded by Intestinal Mucosal Damage and Microbiome Changes and Is Associated with Systemic Inflammation in a Cohort of Peruvian Infants. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *101*(5), 1009.
<https://doi.org/10.4269/AJTMH.18-0975>
- Zhang, D., Jian, Y. P., Zhang, Y. N., Li, Y., Gu, L. T., Sun, H. H., Liu, M. Di, Zhou, H. L., Wang, Y. S., & Xu, Z. X. (2023). Short-chain fatty acids in diseases. *Cell Communication and Signaling* *2023 21:1*, *21*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/S12964-023-01219-9>
- Zoghi, S., Sadeghpour Heravi, F., Nikniaz, Z., Shirmohamadi, M., Moaddab, S. Y., & Ebrahimzadeh Leylabadlo, H. (2024a). Gut microbiota and childhood malnutrition: Understanding the link and exploring therapeutic interventions. *Engineering in Life Sciences*, *24*(5), 2300070. <https://doi.org/10.1002/ELSC.202300070>
- Zoghi, S., Sadeghpour Heravi, F., Nikniaz, Z., Shirmohamadi, M., Moaddab, S. Y., & Ebrahimzadeh Leylabadlo, H. (2024b). Gut microbiota and childhood malnutrition:

Understanding the link and exploring therapeutic interventions. *Engineering in Life Sciences*, 24(5), 2300070. <https://doi.org/10.1002/ELSC.202300070>

Apéndices

Apéndice A



Ingeniera
Diana Carvajal Aldaz, PhD.
Investigador Principal
Ciudad.-

Referencia: Proyecto de Investigación "Impacto del programa de desayunos saludables de la fundación YO SIEMBRO en la prevalencia de desnutrición en niños ≤ 5 años moradores del sector Monte Sinaí del cantón Guayaquil durante la pandemia COVID-19".

Estimada Ingeniera:

Informamos a usted que el Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos del Hospital Luis Vernaza, en sesión extraordinaria No.230, con fecha 08 de diciembre del presente año, se evaluó y aprobó el proyecto de la referencia:

Documentos revisados y aprobados:

- **Protocolo:**
Fecha de la versión/estado: Versión 1.0 / 25-octubre-2021.
- **Hoja de Guía de observación:**
Fecha de la versión/estado: Versión 1.0 / 25-octubre-2021.
- **Declaratoria de Ausencia de Conflicto de Intereses.**
Declaración de conflicto de intereses por parte de todos los investigadores participantes del proyecto.
- **Curriculum Vitae** y antecedentes del Investigador Principal.

El Comité de Ética ha tomado en cuenta para su aprobación los objetivos del proyecto y el desarrollo de la metodología a aplicarse para lograr dichos objetivos que consta en los documentos revisados.

Puntualizamos la obligatoriedad de notificar al Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos, cualquier circunstancia o efecto adverso que ocurra durante la investigación, junto con la explicación de su ocurrencia y manejo. También se debe entregar al Comité informes semestrales y final del proyecto.

Se recuerda que, según las normas bioéticas, las muestras biológicas almacenadas para estudios posteriores, estos deben ser en el ámbito de la investigación original y se debe obtener una nueva autorización para dicho estudio al Comité de Ética.

La aprobación del protocolo de la referencia expira el 08 de diciembre de 2022. Le deseo éxitos en su investigación.

Sin otro particular me suscribo de Usted.
Junta de Beneficencia de Guayaquil
HOSPITAL LUIS VERNAZA

Atentamente,

PRÉSIDENTE
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

Dr. Alfonso Tafur Briones
Presidente Comité de Ética en Investigación
comitedeticahly@jbgve.org.ec
PBX 2560300 Ext. 3029

Apéndice B

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MADRES O REPRESENTANTES LEGALES DE INFANTES

Consentimiento Informado para recolección de información por medio de entrevistas, evaluación nutricional, recolección de muestras biológicas y registro foto – video

Título de la investigación: “Impacto del programa de desayunos saludables de la fundación YO SIEMBRO en la prevalencia de desnutrición en niños \leq 5 años moradores del sector Monte Sinaí del cantón Guayaquil durante la pandemia COVID-19.”

Instituciones encargadas del desarrollo del estudio: Escuela Superior Politécnica de Litoral (ESPOL) y Fundación YO SIEMBRO

Nombre de las investigadoras principales y patrocinador:

- Ph.D. Diana Gabriela Carvajal Aldaz (Escuela Superior Politécnica del Litoral - ESPOL)
- Patrocinador: Claudia Salem, Fundación YO SIEMBRO

Este documento consta de dos partes:

1. Información detallada sobre el estudio.
2. Formulario de firma del consentimiento informado.

1. Objetivo de la investigación

Su hijo(a) o representado legal ha sido invitado(a) a participar en un estudio que quiere evaluar el impacto del programa de desayunos saludables de la fundación YO SIEMBRO en la prevalencia de desnutrición en niños \leq 5 años moradores del sector Monte Sinaí durante la pandemia COVID-19. Es decir, esta investigación busca evaluar si el programa de desayunos saludables y la educación sobre temas de prácticas alimenticias e higiene relacionada a alimentos sirve de modelo para ayudar a mejorar el estado nutricional de los niños (as) en comunidades como las del Monte Sinaí o si es necesario realizar ajustes. Además, se busca entender si existe relación entre el COVID-19 y la desnutrición infantil.

***Nota:** En caso de no entender alguna de las palabras o conceptos citados en el documento, no dude en preguntar. De ser así, se le informa que se tomará todo el tiempo necesario para explicárselo según se avanza. También pueden hacer preguntas ahora, durante o después de haber terminado de leer el documento, antes de brindar su consentimiento o incluso después si usted lo deseara.*

2. Criterios de inclusión y exclusión de los infantes

Criterios de inclusión

- Infantes entre 6 meses a 5 años

Criterios de exclusión

- Infantes con complicaciones agudas severas (diarrea, vómitos, fiebre, anorexia, neumonía, estado de consciencia alterado) e infantes con malnutrición secundaria (historia de enfermedad cardiaca, hepática, renal, cáncer y enfermedad inflamatoria intestinal)

3. Procedimientos y Protocolos

El desarrollo de la investigación se realizará en la comunidad del Monte Sinaí ubicada en el cantón Guayaquil, Guayas – Ecuador. Esta investigación tendrá una duración de un año. El programa nutricional

de la Fundación YO SIEMBRO se enfoca en tres acciones concretas: (1) entrega de desayunos nutritivos, (2) servicio de exámenes clínicos y (3) educación nutricional. Los desayunos nutritivos se proveen tres veces por semana a infantes menores de 5 años moradores de Monte Sinaí. Los desayunos son diseñados según sus requerimientos nutricionales. Además, cada seis meses los infantes acceden de forma voluntaria al servicio gratuito de exámenes bioquímicos de sangre y de heces. Dichos exámenes consisten en un hemograma completo, un examen coproparasitario para evaluar presencia/ausencia de protozoarios y un coprocultivo para determinar la presencia de bacterias causantes de infecciones intestinales. Estos servicios son donados por el laboratorio clínico ONELABT. La mitad de las muestras de heces serán almacenadas y preservadas por el equipo de investigación de este proyecto para futuras investigaciones relacionadas a microbiota intestinal. Adicionalmente, la Fundación YO SIEMBRO realiza educación nutricional a los cuidadores de los infantes y a los encargados del comedor comunitario gracias a voluntarios. A continuación, explicamos detalladamente los procedimientos que se seguirán durante el estudio.

- **Encuesta nutricional**

La encuesta de nutrición está basada en preguntas sobre sus hábitos alimenticios, prácticas de lactancia materna, frecuencia de alimentación, etc. Además, se realiza pregunta a los padres o representantes de infantes sobre el nivel de educación, número de hijos, entre otras. Se estima que la encuesta dure aproximadamente 10 minutos. Estarán a cargo de estas actividades Diana Carvajal-Aldaz, Ph. D., Luz Valencia M.Sc, Lic. Carlos Ordóñez.

- **Evaluación nutricional a infantes.**

Esta evaluación nos permitirá determinar el estado nutricional del niño, es decir si el infante presenta un crecimiento adecuado para la edad. Se tomarán medidas tales como peso, longitud o altura y se realizará una exploración física para ver si existen signos clínicos relevantes. Para mayor confianza estos procedimientos serán realizados por nutricionistas y por una médica. Estarán a cargo de estas actividades Luz Valencia, M.Sc., Gabriela Cucalón, M.Sc., Gabriela Carvajal, M.Sc., Med. Alexandra Jiménez, Lic. Carlos Ordóñez con la colaboración de las madres y/o representantes legales. Se calcula que esta evaluación dure máximo unos 10 minutos.

- **Exámenes clínicos de sangre y heces**

Como parte del programa nutricional de la fundación YO SIEMBRO, se ofrecerá el servicio de exámenes clínicos gratuitos a los infantes. Para ello, le tomarán muestra de sangre a su hijo(a) o representado(a) legal para hacer exámenes de hemograma completo, esto son exámenes que nos permiten saber cómo están los glóbulos rojos, blancos, si tiene mucho o pocos. Con esta información podemos saber, por ejemplo, si el infante presenta anemia. Estos exámenes se realizarán tres veces: al inicio del estudio y cada seis meses. Además, le solicitarán que presente una muestra de heces para ver si hay parásitos o microbios que causen infección.

Manejo de las muestras biológicas

Sus muestras no van a ser analizadas en el extranjero. Luego de los análisis bioquímicos de su sangre, el remanente de esta será descartada por el Laboratorio Clínico que realiza el análisis. El remanente de las muestras de heces si será almacenada para futuras investigaciones, relacionadas al estudio propuesto aquí. Sus muestras no serán compartidas con nadie fuera de nuestro equipo de investigación.

- **Prueba rápida de COVID-19**

Se realizará una prueba rápida de COVID-19 de anticuerpos a su hijo(a). Para dicha prueba se realizará una punción en el dedo de la mano, o en el talón del pie en el caso de tratarse de bebés, para extraer unas gotitas de sangre.

- **Registro de fotos y videos**

Es necesario la documentación de las actividades que se realicen para la investigación, por lo que se tomarán fotos y grabarán videos en el transcurso de las entrevistas semi estructuradas, evaluación nutricional y de salud.

4. Riesgos y molestias

- **Reconocimiento de información clínica:** se mantendrá la confidencialidad de los datos personales. Las muestras serán codificadas para su análisis.
- **Evaluación nutricional:** es posible que el/la bebé se sienta un poco inquieto al momento de realizar las mediciones corporales (peso, longitud o altura). Por esta razón las mediciones serán realizadas en presencia y con la colaboración de sus padre o representantes legales.
- **Muestras de sangre:** durante el procedimiento para obtener la muestra de sangre el/la bebé o niño(a) puede sentir dolor e incluso puede llorar. En algunos casos se puede presentar un moretón, pero este desaparecerá en algunos días.
- **Toma de muestras de heces:** ciertas veces puede ser puede incómodo recoger las heces por su olor o aspecto.
- **Prueba rápida COVID-19:** durante el procedimiento para obtener la muestra de sangre el/la bebé o niño(a) puede sentir dolor e incluso puede llorar.

5. Beneficios

Los beneficios de poder acceder a exámenes preventivos sin costo y que la información que entregue es sumamente valiosa para el estudio de investigación. Estos análisis permiten conocer el estado nutricional y patrón alimentario, información base para poder dar recomendaciones de salud. En el caso de encontrar que un infante tenga desnutrición, anemia, o alguna alteración en su salud se le avisará sobre el estado de salud y se le enviará al centro de salud del MSP para que pueda iniciar algún tipo de tratamiento.

Todos los exámenes relacionados con su participación en este estudio serán gratuitos. En cuanto al potencial beneficio del infante por participar, permite comprender la eficacia de las intervenciones de desayunos saludables en comunidades como las del Monte Sinaí y permitirá servir de modelo para futuras ayudas comunitarias. Además, el conocimiento

6. Participación Voluntaria

Usted, al igual que los demás participantes seleccionadas, pueden elegir LIBRE y VOLUNTARIAMENTE si su hijo (a) o representado(a) legal puede participar o no en el estudio.

7. Incentivos

Ser parte del estudio no implica un incentivo económico para usted o para alguno miembro de su familia.

8. Confidencialidad

La información de salud, los datos personales y los resultados de los análisis de las muestras biológicas, se mantendrán de forma confidencial de acuerdo con la ley del Estado Ecuatoriano. Esta información sólo se utilizará con propósitos de investigación.

Su hijo (a) o representado(a) legal, al igual que todos los participantes serán provistos de un código único como identificación durante el proyecto. Ningún reporte llevará el nombre del infante a fin de mantener oculta y confidencial su identidad. Solamente los investigadores involucrados en el proyecto, y a quienes usted conocerá a lo largo de la ejecución del proyecto, conocerán su identidad, pero bajo ningún motivo la revelarán.

Los resultados los recibirán las madres en un sobre sellado y con este código por la PhD. Diana Carvajal. Las muestras biológicas serán utilizadas exclusivamente para esta investigación.

9. Derecho a negarse o retirarse del estudio

Esto es una reconfirmación, no es obligatorio participar en la investigación. Como se mencionó anteriormente la participación de su hijo(a) o representado(a) legal en este estudio es voluntaria, es decir, usted puede decidir NO QUIERO participar. Si usted decide permitir la participación del infante, puede retirarse del estudio en cualquier momento. No habrá sanciones, ni pérdida de beneficios si usted decide no participar, o decide retirarse del estudio antes de su conclusión.

En caso de que una madre y/o infante decida retirarse del estudio después de que se hayan tomado las muestras biológicas, estas no serán consideradas para el estudio

10. A quién contactar

Usted puede contactar a la investigadora principal del estudio en caso de que tenga dudas o preguntas durante el desarrollo del estudio.

PhD. Diana Gabriela Carvajal Aldaz
Correo: dgcarvaj@espol.edu.ec
Celular: 0969069982

11. Datos del Comité de bioética que aprobó el protocolo de investigación:

Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos

Teléfono: 2560 300 Ext. 3029. Correo electrónico: edaquilema@jbggye.org.ec / comitedeticahlv@jbggye.org.ec

Dirección (oficina): Hospital Luis Vernaza, Loja 700 y Escobedo, en el Área de Pensionado.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INFANTES

“Impacto del programa de desayunos saludables de la fundación YO SIEMBRO en la prevalencia de desnutrición en niños ≤ 5 años moradores del sector Monte Sinaí del cantón Guayaquil durante la pandemia COVID-19”

He leído o me han explicado de manera detallada el propósito de este estudio, así como los riesgos, beneficios y las opciones de mi hijo(a) o representado(a) como participante. Entiendo que se guardará absoluta confidencialidad de toda la información, los datos recolectados y exámenes realizados. Entiendo que puedo retirar a mi hijo(a) o representado legal del estudio cuando yo así lo quiera, y no habrá ninguna consecuencia desfavorable para mí.

Yo, _____, habiendo sido informado sobre la realización del estudio, llevado a cabo por la Escuela Superior Politécnica de Litoral (ESPOL) y la fundación YO SIEMBRO, bajo la dirección de Diana Gabriela Carvajal Aldaz (ESPOL).

- **Acepto** que mi hijo(a) o representado(a) participe en el estudio de investigación. Acepto que se tomen fotografías, se graben audios y vídeos siempre y cuando se mantenga la confidencialidad de todos sus datos.
- **Acepto** que mi hijo(a) o representado(a) sea evaluado(a) nutricionalmente.
- **Acepto** que a hijo(a) o representado(a) se le tomen muestras de sangre y heces para los análisis médicos.
- **Acepto** que los resultados de los exámenes clínicos de mi hijo(a) o representado(a) sean compartidos a los investigadores para que puedan determinar su estado de salud.
- **Acepto** que las muestras de heces remanentes de mi hijo(a) o representado(a) sean almacenadas y utilizadas para futuras investigaciones relacionadas al objetivo del presente proyecto.
- **Reconozco** que la información que se provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento.
- **Entiendo** que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada, y que puedo pedir información si tengo dudas y que los resultados de los exámenes médicos y de salud me serán entregados.
- **Entiendo** que si hay preguntas durante el estudio puedo contactarme con la investigadora principal PhD. Diana Carvajal al número 0969069982.

Si considera que no hay dudas, ni preguntas acerca de su participación de la participación de su representada puede, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

PARA PADRES O REPRESENTANTES LEGALES DE LOS INFANTES

Nombres y apellidos del padre/madre/representante legal

Nombres y apellidos del infante

Cédula de identidad

Firma

Lugar y fecha

Dirección de residencia
del participante

Número de contacto
del participante

Yo, el abajo firmante, reconozco haber proporcionado toda la información necesaria para la comprensión del proceso de selección para la presente investigación para la persona mencionada anteriormente. Yo certifico que, en la medida de mi conocimiento, la persona que firma este consentimiento comprende la naturaleza, las demandas, los beneficios y riesgos de participar, y que su firma es válida y dada libremente.

Diana Carvajal Aldaz
Investigadora principal
Firma

Cédula de identidad

Fecha

CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

“Impacto del programa de desayunos saludables de la fundación YO SIEMBRO en la prevalencia de desnutrición en niños \leq 5 años moradores del sector Monte Sinaí del cantón Guayaquil durante la pandemia COVID-19”

Investigadoras principales:

PhD. Diana Gabriela Carvajal Aldaz

Organización de la investigadora:

Escuela Superior Politécnica de Litoral (ESPOL)

Por medio del presente documento quiero informar mi decisión de retirar a mi hijo(a) o representado (a) legal como participante del estudio de investigación por las siguientes razones (opcional):

Nombres y apellidos de la participante

Cédula de identidad

Firma

Fecha

Nombres y apellidos del testigo

Cédula de identidad

Firma

Fecha

*Se elaborará dos ejemplares y se entregará una copia a la madre/padre/representante legal del participante.

Apéndice C

Formulario de toma de datos - infantes

* Required

* This form will record your name, please fill your name.

Datos generales y antropometría del infante

1

Ingresar código del tutor/padre *

2

Ingresar código de infante *

3

Fecha de nacimiento del niño/a (mes-día-año) *

4

Sexo del niño *

Hombre

Mujer

5

¿Se ha enfermado su hijo/a de COVID-19? *

Sí

No

6

Peso (kg) *

The value must be a number

7

Talla/longitud (cm) *

Criterios excluyentes

8

¿Ha tenido diarrea en la última semana? *

- Sí
- No

9

¿Ha tenido vómito en la última semana? *

- Sí
- No

10

¿Ha tenido fiebre en la última semana? *

- Sí
- No

11

¿Ha tenido falta de apetito en la última semana? *

- Si
- No

12

¿Ha tenido neumonía en la última semana? *

- Sí
- No

13

¿Estado de conciencia alterado? *

Sí

No

14

¿Sufre el niño de enfermedades del corazón? *

Sí

No

15

¿Sufre el niño de enfermedades del hígado? *

Sí

No

16

¿Sufre el niño de enfermedades de los riñones? *

Sí

No

17

¿Sufre el niño de cáncer? *

Sí

No

¿Sufre el niño de enfermedades intestinales? *

Sí

No

Exploración Física

Realizar la exploración física y registrar si existen hallazgos anormales.

19

Estado de hidratación *

Saludable

Anormal

20

Masa muscular *

Saludable

Anormal

21

Panículo adiposo *

Saludable

Anormal

22

Piel y faneras *

Saludable

Anormal

23

Ojos *

Saludable

Anormal

24

Nariz *

Saludable

Anormal

25

Cavidad oral *

Saludable

Anormal

26

Cuello *

Saludable

Anormal

27

Tórax *

Saludable

Anormal

28

Abdomen *

Saludable

Anormal

29

Extremidades *

Saludable

Anormal

30

Sistema cardiovascular *

Saludable

Anormal

31

Sistema nervioso *

Saludable

Anormal

32

Aparato digestivo *

Saludable

Anormal