



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL RECIÉN NACIDO Y SU
RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO Y ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES
INFECCIOSAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

PORTILLO BOBADILLA TOBÍAS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. TERESA CECILIA XIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS JOSÉ DELAYE ARREDONDO
CINVESTAV IRAPUATO

COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., MARZO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL RECIÉN NACIDO Y SU
RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO Y ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES
INFECCIOSAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

PORTILLO BOBADILLA TOBÍAS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. TERESA CECILIA XIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS JOSÉ DELAYE ARREDONDO
CINVESTAV IRAPUATO

COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., FEBRERO 2016

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de noviembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **PORTILLO BOBADILLA TOBIAS** con número de cuenta **93198538**, con la tesis titulada "**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL RECIÉN NACIDO Y SU RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO Y ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES INFECCIOSAS**", realizada bajo la dirección de la **DRA. CECILIA TERESA XIMÉNEZ GARCÍA**:

Presidente: DRA. MARÍA ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO
Vocal: DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ
Secretario: DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ
Suplente: DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA
Suplente: DR. ISAAC GONZÁLEZ SANTOYO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 19 de enero de 2017

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.**

Al **Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT)** por la Beca Continua de Posgrado, primera promoción 2012, que me otorgó por un período de 6 meses para realizar los estudios de Maestría.

Al **Instituto Mexicano del Seguro Social** a través del **Fondo de Investigación en Salud** por el sueldo otorgado por concepto de Servicios Profesionales durante 6 meses para realizar el **Procesamiento y análisis Bioinformático de los resultados sobre microbioma** en Xoxocotla, Morelos (proyecto FIS/IMSS/PROT/699).

Este trabajo también fue apoyado por el **CONACYT** (proyecto 2010-01-140990), la **UNAM**, México (proyecto 279 PAPIIT -IN-226511) y el **Instituto Mexicano del Seguro Social** (recursos 699) en donde el **Dr. Francisco Javier Torres López** es beneficiario de una beca de exclusividad del IMSS, México.

A los miembros del Comité Tutor: **Dra. Cecilia Teresa Ximénez García, Dr. Luis José Delaye Arredondo y Dr. Carlos Federico Arias Ortiz.** Les agradezco por su asesoría y disposición, así como los comentarios y conocimientos valiosos que me brindaron para enriquecer y concluir exitosamente la tesis que presento.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la comunidad de Xoxocotla Morelos le debo mi esfuerzo, agradezco mucho su amistad, amabilidad y confianza para poder realizar este proyecto.

A las enfermeras Evelia, Leonor, Ofelia, Yadira y Xochiquetzalli por su gran esfuerzo e importante trabajo con la comunidad.

A todos mis amigos y compañeros de profesión que me acompañaron a lo largo de esta maravillosa experiencia y que me brindaron su amistad, apoyo, guía y sabiduría. Y que aportaron valiosos comentarios para mejorar esta tesis. Mil gracias.

A la Dra. Cecilia Teresa Ximénez García, pues me brindó la oportunidad de trabajar en su laboratorio, hacer investigación y poder continuar por el camino de la ciencia, pero sobre todo por su gran amistad y paciencia.

Al Dr. Francisco Javier Torres López, una mención especial por el apoyo otorgado y por la confianza de contratarme al inicio del proyecto, lo cual fue un gran impulso para poder continuar con mi desarrollo personal, académico y profesional.

A Liliana Rojas Velázquez, Miriam E. Nieves Ramírez y Alicia Valadez por su gran amistad, aprendí mucho de ustedes, por su paciencia y apoyo con los PCRs, geles y demás técnicas experimentales, sin las cuales sin duda la bioinformática no existiría.

A mis compañeros del Laboratorio, de nuevo mil gracias, Enrique, Alicia, Paty, Eric, Lulú, Oswaldo, Valeria por su retroalimentación diaria y ser excelentes amigos.

A los que se sumaron en la recta final de este proyecto. A la Dra. Nancy Mejía Domínguez por su valiosa asesoría en los análisis estadísticos.

A mi familia, por su apoyo de toda la vida. A mis padres, por apoyarnos en todo lo que emprendemos, les debo a ellos lo que soy.

A Paco, Miguel, Alán, Juanito y Laura que me han enseñado a seguir adelante y luchar con alegría para conseguir lo que soñamos.

A Bertha Pérez Hernández por su apoyo y asesoría en las técnicas de biología molecular. Y por ser una parte muy importante en mi vida. Mil gracias.

A todos mis profesores y alumnos. A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *Alma mater*, a la cual le debo mi carrera profesional, con un gran cariño y aprecio.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
ABREVIATURAS	ii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO GENERAL	6
OBJETIVOS PARTICULARES	7
ANTECEDENTES	8
METODOLOGÍA	11
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	41
LITRATURA CITADA	43
ANEXOS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica de Xoxocotla e IMC de la cohorte.

Figura 2. Gráficas de peso para la edad, peso para la talla e IMC de los infantes.

Figura 3. IMC por semana de cada niño y niña a lo largo de los dos años de seguimiento, mostrando bajo peso, peso normal, sobrepeso y obesidad.

Figura 4. Intervalos de tiempo establecidos para realizar el seguimiento de la microbiota en las muestras de heces de los 10 infantes seleccionados.

Figura 5. Calidad de las secuencias obtenidas por secuenciación masiva NGS después de haber realizado el análisis primario de los datos.

Figura 6. Distribución de la profundidad de secuenciación por muestra.

Figura 7. Asignación de las OTUs a diferentes niveles taxonómicos.

Figura 8. Evolución de la dinámica de la composición de bacterias a nivel de Phylum y géneros a lo largo de los dos primeros años de vida, incluyendo a las madres.

Figura 9. Evolución de la dinámica de la composición de bacterias en los infantes.

Figura 10. Distribución comparativa de las abundancias relativas de los taxa *top20*, a diferentes tiempos en los dos grupos de infantes estudiados.

Figura 11. OTUs más prevalentes en los infantes nacidos por vía vaginal y cesárea.

Figura 12. Diferencias en la diversidad de la microbiota intestinal entre los niños nacidos por cesárea vs parto a los 2 y 24 meses.

Figura 13. Curvas de rarefacción de la diversidad alfa de todas las muestras incluyendo a los infantes y a las madres.

Figura 14. Medidas de la diversidad alfa de las comunidades bacterianas en los infantes nacidos por cesárea versus parto a lo largo del seguimiento.

ABREVIATURAS

IMC: Índice de masa corporal.

NGS: Secuenciación masiva de nueva generación (del inglés *next generation sequencing*).

16S: Gen del RNA ribosomal 16S.

OTU: Unidad taxonómica operativa.

Calidad Q20, Q30: Es una medida para evaluar la calidad de la secuenciación. Se define como el $-10 \log$ base 10 de la probabilidad de error en la asignación de las bases. Q20 significa un error por cada 100 pb y Q30 un error por cada 1000 pb.

Demultiplexación: Procedimiento bioinformático aplicado a los datos de secuenciación masiva NGS para separar las lecturas que corresponden a una muestra en particular. Se utiliza un fragmento conocido de 6, 8 o 12 pb (el índice o código de barras) para poder identificar la procedencia de las lecturas.

Pipeline: Procedimiento de varios pasos de un análisis o rutina bioinformática.

PCoA: Análisis de coordenadas principales.

Profundidad de secuenciación: Cantidad de lecturas obtenidas (por muestra o experimento) en la NGS.

Lecturas: Del inglés "*reads*" son cada una de las secuencias obtenidas por NGS.

Lecturas pareadas: Del inglés "*paired ends*" son dos lecturas que derivan de un mismo fragmento, el cual es secuenciado por ambos extremos.

Lecturas quiméricas: Son lecturas artificiales formadas por dos o más secuencias que provienen de organismos distintos.

RESUMEN

Durante los primeros días de vida los bebés están expuestos continuamente a una miríada de microorganismos en el medio ambiente y la composición de éstos cambia constantemente hasta alcanzar una estructura estable en el adulto. En base a la evidencia previa sobre el papel que tiene el tipo de parto y la lactancia materna en la estructura de la microbiota intestinal, se estudia la dinámica de la colonización y los cambios en la estructura de la microbiota intestinal de los niños desde el nacimiento hasta los 24 meses de edad en una comunidad rural, Xoxocotla, en el estado de Morelos, México. Este es un estudio longitudinal realizado de septiembre de 2010 a enero de 2012 y los datos analizados provienen de las muestras de heces de 10 binomios madre-hijo. Los resultados no muestran diferencias significativas entre la microbiota de los bebés nacidos por cesárea y los nacidos por vía vaginal al cabo de los 24 meses, las diferencias se mostraron a los primeros meses de vida, las cuales con el tiempo se diluyen. Esto puede deberse en cierta medida a factores sociales y culturales asociados a las costumbres y condiciones particulares del modo de vida de los habitantes de la comunidad. La diversidad bacteriana aumenta con la edad y los taxa más representados al inicio del estudio, como es el caso del género *Bifidobacterium*, disminuyen para dar lugar a la llegada y establecimiento de otras bacterias. Observamos también que no se alcanza una estructura estable al término de los 2 años del estudio, como algunos trabajos lo reportan.

ABSTRACT

During the first days of life, infants are continuously exposed to a myriad of microorganisms in the environment, and the composition of the microbiota constantly changes until it reaches a stable structure in adulthood. Based on previous evidence, on the role or possible impact that the type of delivery and maternal breast feeding has on the structure of the intestinal microbiota, we study the dynamics of colonization and changes of the structure of the intestinal microbiota of children from birth up to 24 months of age from a rural community, Xoxocotla, in the state of Morelos, in Mexico. The analyzed data come from stool samples of 10 mother-infant binomials from a longitudinal follow-up study conducted from September 2010 to January 2012. Results show that there are not significant differences between the microbiota from babies born by caesarean section and those born vaginally at the end of 24 months, the differences are notorious mainly at the first months of life but these disappear later. This may be explained to some extent by social and cultural issues associated to particular customs and life conditions in the community. Bacterial diversity gradually increases with age and the most prevalent taxa at initial stages of the study, as it is the case of *Bifidobacterium*, diminished to leave opportunities for the arrival and establishment of other bacteria. Also, we observed that a stable structure is not achieved along the two years of the study as it is shown by some studies.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la microbiota en los seres humanos ha adquirido una notable atención en los últimos años (Lloyd-Price et al., 2016). Esto debido a los avances recientes en los métodos moleculares usados para dilucidar las complejas comunidades de microorganismos que habitan en diferentes sitios de la mucosa y piel de los seres humanos, así como en modelos animales (Cho et al., 2012; Guarner et al., 2003). En los seres humanos, la microbiota intestinal es una de las comunidades microbianas con la mayor abundancia y diversidad de microorganismos presentes (Human Microbiome Project Consortium, 2012; Li et al., 2012), y se considera como otro "órgano" con funciones e implicaciones importantes para la salud y la enfermedad. Este órgano tiene un papel central en el aprovechamiento de la energía proveniente de la dieta, en la producción de nutrientes esenciales, en el desarrollo y maduración del sistema inmunológico o en la protección contra patógenos (Cho et al., 2012; Kau et al., 2011). El desequilibrio de este ecosistema o disbiosis se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades graves como la diabetes, la enfermedad inflamatoria intestinal o la enterocolitis necrosante en bebés prematuros (Coggins et al., 2015; Oświęcimska et al., 2017; Romano-Keeler et al., 2012; Yu and Qin, 2013). Algunas evidencias sugieren que la microbiota intestinal y gástrica tienen un posible papel en el desarrollo del cáncer gástrico (Cao and Yu, 2015), o incluso de forma cada vez más reconocida, en los trastornos neurológicos y conductuales tales como el autismo y la depresión (Mangiola et al., 2016; Reddy and Saier, 2015). Esto último, a través de la relación microbiota-intestino-cerebro, la cual es modulada por rutas de señalización

metabólica, neuronal, endócrina e inmunológica (Bauer et al., 2016; Fung et al., 2017; Kelly et al., 2015; Mayer et al., 2015).

Trabajos recientes señalan que los bebés probablemente están expuestos a las comunidades microbianas desde antes del nacimiento, posiblemente siendo colonizados en el útero por la microbiota de la placenta y del líquido amniótico (Aagaard et al., 2014; Collado et al., 2016). Después del parto, los bebés entran en contacto con microorganismos que provienen principalmente de sus propias madres (Dethlefsen et al., 2006; Palmer et al., 2007). La composición de la microbiota en los niños de tres años de edad es extraordinariamente variable debido a diversos factores ambientales y a circunstancias inherentes al crecimiento y desarrollo de los niños durante los primeros años de vida. El estilo de vida moderno y los elementos culturales de los países desarrollados, así como de las comunidades subdesarrolladas, probablemente también son factores que dirigen los cambios en la composición de la microbiota (Blaser and Falkow, 2009). La mayor parte del conocimiento sobre el papel de estos factores, que están asociados al reciente aumento de muchas enfermedades y de la disbiosis intestinal, se ha realizado en individuos caucásicos o anglosajones (Lloyd-Price et al., 2016).

Las técnicas independientes de cultivo como son los métodos de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) han cambiado drásticamente el estudio de la microbiota y abren la posibilidad de analizar las complejas comunidades microbianas (Hiergeist et al., 2015; Lau et al., 2016). Estos métodos moleculares basados en los ácidos nucleicos, alternativos a los métodos basados en cultivo, están ya muy bien establecidos para el estudio de la microbiota. La metagenómica, en donde se analiza el DNA total del ambiente, y la secuenciación NGS de los genes rRNA ribosomales

16S y 18S, son aproximaciones de elección muy informativas y ampliamente utilizadas para este tipo de estudios del microbioma. En particular, los estudios basados en la secuenciación del gen del RNA ribosomal 16S, son más asequibles para la mayoría de los laboratorios de investigación en los países en desarrollo.

Una serie de factores que pueden influir en la dinámica de colonización y establecimiento de la microbiota intestinal en los niños es la exposición prenatal a algunas bacterias como *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, que infectan el líquido amniótico y están asociadas con enfermedades infecciosas tales como la corioamnionitis y con el parto prematuro, o la infección por *Clostridium* que está asociada a la enterocolitis necrosante (Coggins et al., 2015; Hosny et al., 2017). De hecho, las infecciones vaginales pueden predisponer a los bebés al parto prematuro (Hillier et al., 1995). A pesar de que la translocación de bacterias del intestino a la sangre u a otros órganos ha sido establecida, al igual que la presencia de bacterias en el líquido amniótico y en la placenta, su importancia en el desarrollo del microbioma intestinal en el humano no ha sido claramente documentada.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente estudio es caracterizar la microbiota intestinal en niños mexicanos y analizar la dinámica de la colonización en un estudio longitudinal desde el nacimiento hasta los 24 meses de edad, contrastando la microbiota intestinal de los niños nacidos por cesárea versus parto. Seleccionamos el método de secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA, que es el gen marcador estándar empleado actualmente para el análisis de comunidades microbianas mediante la secuenciación masiva usando la plataforma MiSeq.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Construir una cohorte de binomios madre-hijo a partir del nacimiento y hasta los 24 meses de edad en la comunidad rural de Xoxocotla Morelos, a fin de dar seguimiento de los infantes a través del estudio de muestras fecales consecutivas.
2. Obtener información antropométrica del niño (peso y talla) y tipo de alimentación de los bebés (leche materna o fórmula), incluyendo el registro de los eventos patológicos del niño desarrollados durante el seguimiento haciendo énfasis en procesos infecciosos gastrointestinales y del uso de antibióticos durante los primeros dos años.
3. Tomando en cuenta criterios de inclusión y exclusión seleccionar una muestra de 10 binomios madre-hijo de quienes se obtendrán muestras de heces para la extracción de DNA que se analizará mediante la secuenciación masiva del gen 16S rRNA ribosomal.
4. Realizar el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas y analizar las diferencias entre los individuos mediante pruebas estadísticas para determinar su significancia. Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias se compararán entre el grupo de niños nacidos por parto vaginal versus los resultados obtenidos en los niños nacidos por cesárea.

ANTECEDENTES

Uno de los factores que parece influir en el desarrollo y establecimiento de la microbiota en los infantes es el tipo de alumbramiento. En los últimos años, por ejemplo, la práctica de la cesárea se ha incrementado en las comunidades, en particular debido a la alta frecuencia de embarazos en adolescentes y en niños. En México la frecuencia de cesárea versus parto es de 37.8% en el 2006 (Villar et al., 2006) (Gibbons et.al, 2010) y de 46.9% en el 2012 (Heredia-Pi et al., 2014). En comparación con el 26% de los niños nacidos en Canadá o con el 13.5% en los países bajos (Gibbons et.al, 2010). En el presente estudio la frecuencia de cesárea es de cerca del 50%, lo que se considera una sobre indicación de dicho procedimiento en comparación con lo observado en otros servicios institucionales obstétricos en las áreas urbanas de México. La Organización Mundial de la Salud en su reporte 2010 sobre el costo y magnitud de la práctica de la cesárea en 137 países, recomienda que ésta sea entre el 10% y el 15% de los nacimientos. México se ubica en el cuarto lugar de los países con el mayor número de cesáreas no necesarias (sólo por debajo de China, Brasil y Estados Unidos), estimando un costo extra por esta práctica en México de 122 millones de dólares (*World Health Organization Human Reproduction Programme, 10 April 2015*) (Gibbons et.al, 2010).

Existe evidencia de que la microbiota temprana en el ser humano está influida por el tipo de nacimiento. Las poblaciones bacterianas del intestino en los lactantes nacidos por vía vaginal aparentemente son homogéneas dentro del grupo y contrastan con las poblaciones bacterianas que desarrollan los niños nacidos por vía quirúrgica. Los datos de la secuenciación del gen 16S rRNA ribosomal realizado después del

nacimiento demuestran que la microbiota intestinal en el recién nacido es muy similar a la de la microbiota vaginal o de la piel de la madre, por el contrario, las poblaciones bacterianas que encontramos en los niños nacidos por cesárea pueden diferir de la microbiota vaginal de las madres. Además, datos del análisis de muestras de heces provenientes de niños a las 72 horas después del nacimiento, utilizando la técnica de gel de electroforesis en gradiente de temperatura temporal y gradiente desnaturizante en poblaciones bacterianas (TTGE y DGGE, por sus siglas en inglés) muestran diferencias significativas en la composición del intestino de los bebés nacidos por cesárea versus los nacidos por vía vaginal (Biasucci et al., 2010). *Bifidobacterium* y *Bacteroides* son los géneros encontrados con menor frecuencia en niños nacidos por cesáreas (Adlerberth et al., 2006; Grönlund et al., 1999), en comparación con los niños nacidos por vía vaginal. También, la microbiota intestinal de los infantes nacidos por cesárea es claramente menos diversa a los 24 meses después del nacimiento (Jakobsson et al., 2014). Los autores de dichos estudios mencionan que esta disminución en la diversidad bacteriana es consecuencia de una colonización tardía por Bacteroidetes. Algunos de los niños nacidos por cesárea no muestran evidencia de colonización de Bacteroidetes sino hasta el año de edad. Sin embargo, estas diferencias no son evidentes en niños prematuros, estos niños muestran mayor prevalencia de *Clostridium difficile* y especies de *Staphylococcus* (Aujoulat et al., 2014).

Se ha mostrado en diversos estudios que el parto por cesárea da lugar al desarrollo de una serie de trastornos inmunológicos (Bager et al., 2008; Papathoma et al., 2016; Sánchez-Valverde et al., 2009), como la enfermedad del intestino irritable (IBD), en los primeros 14 años de edad con independencia de una historia familiar de

IBD. Sin embargo, en otros estudios recientes no se encontró que el tipo de nacimiento sea un factor de riesgo para la enfermedad de IBD (Bernstein et al., 2016; Li et al., 2014). Los niños que nacen por cesárea se les asocia consistentemente la condición de adiposidad infantil, observada a las 6 semanas de edad, lo cual es más intenso si la madre es obesa (Dogra et al., 2015). Estos niños son 1.83 veces más propensos a tener sobrepeso u obesidad. La explicación más aceptada de esta asociación de la enfermedad es la disbiosis de la microbiota intestinal. Sin embargo, se necesita más investigación para tener un soporte adecuado de estas hipótesis interesantes.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio y características de la cohorte de Xoxocotla

Se construyó una cohorte de binomios madre-hijo en la comunidad de Xoxocotla, estado de Morelos a 130 km al sur de la Ciudad de México. Xoxocotla tiene 21,074 habitantes y el 56% son jefas de hogar o inmigrantes que trabajan en los EE.UU. La mayoría de ellos reciben atención médica básica en dos centros de salud locales pertenecientes a la Secretaría de Salud y cuando se necesita atención hospitalaria los niños son remitidos a un hospital de segundo nivel en Jojutla, un poblado a 30 km al este de Xoxocotla. El poblado de Xoxocotla tiene características sociodemográficas que definen a una población rural marginada, como son una baja densidad de habitantes, viviendas con pisos de tierra, cocinas de leña, una marcada pobreza y rezago social con un limitado desarrollo en infraestructura municipal y de servicios de salud (Informe Anual sobre la Situación de Pobreza y Rezago Social 2010, CONEVAL, www.gob.mx). Además, presenta una gran superficie de suelo salitroso con poca vegetación y disponibilidad de agua. Estas características forman parte de los motivos para desarrollar el trabajo mostrado, con el antecedente en estudios previos, de alta frecuencia de parasitosis intestinales en la población. Los parásitos intestinales son la segunda causa de enfermedad en la comunidad (Anuario de Morbilidad: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>). El estudio es longitudinal, prospectivo y la estrategia para incorporar a la población fue invitando a las mujeres que llegaban en el último trimestre de su embarazo a la Clínica del Embarazo del Centro de Salud como parte de su control rutinario. Éstas eran invitadas a participar

una vez que se les daba una presentación del protocolo de investigación, en el cual se les explicaban los procedimientos de muestreo para la madre y el niño, así como el carácter voluntario de la participación. Todos los procedimientos de laboratorio, estudios clínicos y terapéuticos necesarios en caso de enfermedad eran gratuitos durante su permanencia en el protocolo. Las mujeres embarazadas iban conformando la cohorte justo antes del parto después de firmar voluntariamente una carta de consentimiento informado. Para la realización de este estudio se tiene la aprobación del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y de la Secretaría de Salud del Estado de Morelos.

Criterios de inclusión para las madres. Mujer en el último trimestre del embarazo de tipo normal, con residencia estable en la comunidad, servicios de salud cubiertos por el Seguro Popular y tener un seguimiento completo dentro del Programa de Control de Embarazo del Servicio de Salud del estado de Morelos.

Criterios de exclusión para las madres. Las madres con enfermedades crónicas y degenerativas como la hipertensión y la diabetes mellitus tipo 2. Embarazo de alto riesgo y/o previo embarazo de alto riesgo y la presencia de signos y síntomas de preeclampsia.

Criterios de inclusión para los niños. Recién nacidos a término de madres sanas, peso mayor a 1.5 kg al nacer independientemente del tipo de alumbramiento, cesárea o parto normal por vía vaginal.

Criterios de exclusión para los niños. Malformaciones congénitas del corazón o enfermedades, bajo peso al nacer y bebés prematuros.

Se elaboró un cuestionario socioeconómico y demográfico a partir del cual se obtuvieron variables relacionadas con las características del hogar y de la

disponibilidad de la infraestructura sanitaria. También se investigaron indicadores de hábitos de higiene y los antecedentes patológicos y no patológicos de los miembros de la familia. Estas variables se registran en una base de datos para su posterior análisis estadístico. Después del nacimiento, los bebés fueron visitados semanalmente para tener el registro del estado de salud, la dieta, el uso de antibióticos y capturar los datos antropométricos, así como la toma de muestras de heces.

Categorías del IMC. El índice de masa corporal (IMC) para la edad de los niños y niñas se calculó utilizando la fórmula estándar, que se define como la masa corporal (kg) dividida por el cuadrado de la longitud del cuerpo o altura (cm). Las categorías de “bajo peso”, “peso sano”, “sobrepeso” y “obesidad” se definen en base a los estándares establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) utilizando *Z-scores* y los valores de los percentiles de las tablas ampliadas de crecimiento diario de referencia y se codificaron como variables usando los números 0, 1, 2, 3, respectivamente, para cada una de las muestras. $Z_{score} = (IMC - M) \div SD_{IMC}$ donde $SD_{IMC} = M * S$. Los valores M y S provienen de estas tablas de referencia. El IMC de los infantes se compara con los percentiles de referencia P5, P85 y P95 siguiendo lo establecido por la norma de la OMS, quedando las categorías así definidas:

$$IMC_{Categoría} = \begin{cases} 0 & \text{Bajo peso} & BMI < P5 \\ 1 & \text{Peso normal} & P5 \leq BMI < P85 \\ 2 & \text{Sobrepeso} & P85 \leq BMI < P95 \\ 3 & \text{Obeso} & BMI \geq P95 \end{cases}$$

Tipo de alimentación. Se identifica si a los bebés se les alimenta con leche materna o fórmula, la edad a la que inician la fórmula u otro alimento diferente a la

leche, y la edad en la que dejan de tomar leche materna, a fin de ubicar el periodo de ablactación en los bebés. Las categorías así definidas sobre la alimentación son tres: alimentación sólo por leche materna (pecho), leche materna complementada con fórmula u otro tipo de alimento (combinado) y alimentación en la que ya no se incluye la leche materna (periodo posterior a la ablactación).

Obtención y procesamiento del DNA para la secuenciación del 16S

Se seleccionaron 10 binomios tomados de la cohorte Xoxocotla para realizar el análisis de la diversidad bacteriana, obteniendo un total de 80 muestras de heces de los infantes en intervalos establecidos de 2, 6, 9, 12, 15, 18, 22 y 24 meses de edad. Para la selección de los binomios se consideró tomar 5 muestras de heces de los infantes nacidos por cesárea y 5 por parto normal vía vaginal, incluyendo niños y niñas en proporciones equilibradas de cada grupo. Se procuró que todas las muestras elegidas cubran todos los intervalos de meses previamente definidos. Al total de las muestras de los bebés se le sumó una muestra de heces de la madre antes del parto, obteniendo así un total de 90 muestras de heces de binomios madre-hijo. La secuenciación del DNA proveniente de dichas muestras se hizo con la tecnología de secuenciación masiva NGS de Illumina MiSeq. Las muestras de heces de los infantes se tomaron con un hisopo a partir del pañal y se almacenaron en hielo a 4 °C para ser transportadas a la Ciudad de México, en donde se mantuvieron en el laboratorio a -20 °C previo a la extracción del DNA. Posteriormente, se realizó la preparación de las bibliotecas de secuenciación usando los kits comerciales para el equipo MiSeq de Illumina, que amplifican las regiones hipervariables V3 y V4 del gen 16S, las cuales son utilizadas en este tipo de estudios (Klindworth et al., 2013). Las bibliotecas fueron

cuantificadas, normalizadas e indexadas con diferentes códigos de barras (índices) siguiendo el procedimiento estandarizado para su posterior identificación y análisis bioinformático.

Procesamiento de las secuencias y definición de las OTUs

El análisis primario de los datos, en particular la unión de las lecturas pareadas, eliminación de los adaptadores usados para la preparación de las bibliotecas de secuenciación y la demultiplexación, se realizaron utilizando las herramientas del software QIIME (Caporaso et al., 2010; Navas-Molina et al., 2013). El análisis primario que consistió en el filtrado por calidad y el análisis secundario de los datos referente a la construcción de las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs), la asignación taxonómica y el análisis de diversidad de los taxa, se hizo con el software MICCA (Albanese et al., 2015). Las pruebas estadísticas se realizaron con los paquetes de R (Bioconductor), Phyloseq y Vegan (Dixon and Philip, 2003; Huber et al., 2015; McMurdie and Susan, 2013). Primero, las lecturas pareadas se unieron para formar lecturas de mayor tamaño utilizando *fastq-join* (Aronesty and Erik, 2013), herramienta implementada en QIIME, luego se hace la demultiplexación considerando un error máximo en el código de barras de 4 nucleótidos (la construcción de la biblioteca se hizo con códigos de barras, secuencias, de 12 pb) permitiendo una calidad mínima de Q20. Posteriormente, las lecturas fueron separadas por muestra; obteniendo un archivo FASTQ diferente por cada muestra con el fin de incorporarlos al *pipeline* de MICCA. Usando el software MICCA se unieron los distintos archivos FASTQ correspondientes a cada muestra y se aplicó otro filtro por calidad (basado en los datos) utilizando una tasa de error esperado máximo permitido (EE) de 0.5% y una

longitud mínima de 252 pb (opciones *-e 0.5 m 252*). Se usa *FastQC* (Laboratorio de Babraham <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>) para identificar y evaluar los posibles errores en las lecturas. La construcción de las OTUs se definió a partir de un 97% de identidad de las secuencias, utilizando la opción por referencia abierta (*open reference*) y de novo voraz (*greedy de novo*) los cuales son algoritmos basados en distancias, en este paso también se eliminan las secuencias quiméricas. Se utilizó la base de datos *Greengenes gg_2013_05* (DeSantis et al., 2006) para hacer la asignación taxonómica de las OTUs y el algoritmo NAST para la alineación de las secuencias. Se utilizó el método *FastTree* (Price et al., 2010) para la construcción del árbol filogenético que se utiliza en pasos posteriores para los análisis de diversidad, a continuación se hace la asignación taxonómica para lo cual se emplea el software clasificador propio de la base de datos ribosomal RDP (Wang et al., 2007) incluido en MICCA (para mayor detalle consultar el Anexo 2).

Análisis de diversidad y pruebas estadísticas

Se hace una exploración de la distribución de la profundidad de secuenciación por muestra, para determinar aquellas que deben descartarse del análisis de rarefacción dada su baja profundidad; en este tipo de análisis se recomienda eliminar las muestras que presentan muy pocas lecturas. Se siguen dos análisis, uno global incluyendo las muestras de las madres e hijos y otro incorporando exclusivamente a los infantes, de tal forma que permita comparar la diversidad bacteriana presente en las muestras provenientes de los niños nacidos por parto vs cesárea. Para el análisis global se utiliza QIIME y para el análisis sólo de infantes se utilizó MICCA. Esto se hizo así por conveniencia, dada la facilidad de sus herramientas para manipular los datos

y hacer las gráficas de la composición microbiana. Aplicamos un punto de corte mínimo de 34,893 secuencias por muestra para el análisis global de la diversidad, usando distancias filogenéticas (Faith, 1992). Las curvas de rarefacción se construyeron utilizando dicha profundidad de secuenciación y las abundancias de los taxa. Para este estudio se consideran los siguientes metadatos: el tipo de muestra (si es madre o hijo), el tipo de alumbramiento, el binomio, el intervalo de edad, la categoría del IMC y la alimentación (anexo 1). Los datos del análisis de coordenadas principales (PCoA) se visualizaron utilizando el software *Emperor* (Vázquez-Baeza et al., 2013). Para ilustrar la distribución filogenética y abundancias de los taxa se usó GraPhIAn (Asnicar et al., 2015). Se realizaron pruebas estadísticas multivariadas (Adonis, ANOSIM) para evaluar la significancia estadística de las diferencias en la diversidad observada entre los infantes nacidos por cesárea versus parto.

RESULTADOS

Población de Xoxocotla y características de la cohorte

La cohorte de Xoxocotla consistió de un total de 120 participantes, de los cuales después de hacer una evaluación de qué tan completo resultó el registro y los datos obtenidos de cada binomio madre-hijo, este total se redujo a una población de estudio de 57 binomios. Se muestra el mapa de Xoxocotla en donde se aprecia que la población de infantes en general presenta un IMC normal, ligeramente por arriba de la media (figura 1).

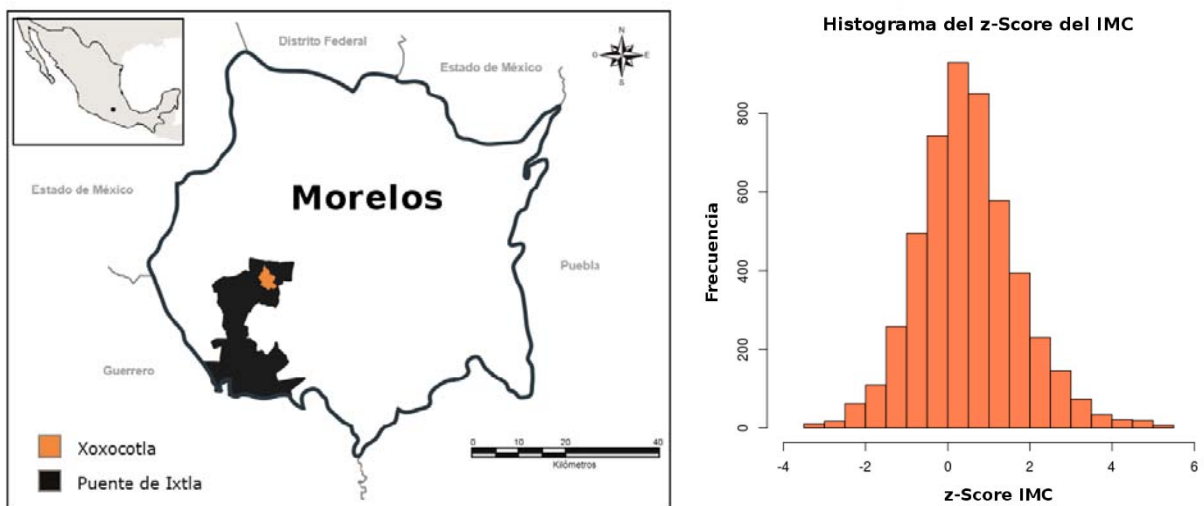


Figura 1. Ubicación geográfica de Xoxocotla (naranja), una comunidad rural ubicada en el municipio de Puente de Ixtla en el estado de Morelos. A la derecha se observa la distribución del IMC de los infantes de la cohorte en términos del Z-score.

Se observa también que los niños en general tienen mayor peso y talla que las niñas, diferencias naturales acorde con el género (figura 2 y 3). Aunque observamos una ligera tendencia hacia los percentiles característicos que definen el sobrepeso, particularmente en los niños, en el caso de las niñas, en ocasiones observamos una

tendencia hacia los percentiles que definen el bajo peso (figura 3). Prácticamente todos los infantes mostraron un crecimiento normal a lo largo del estudio.

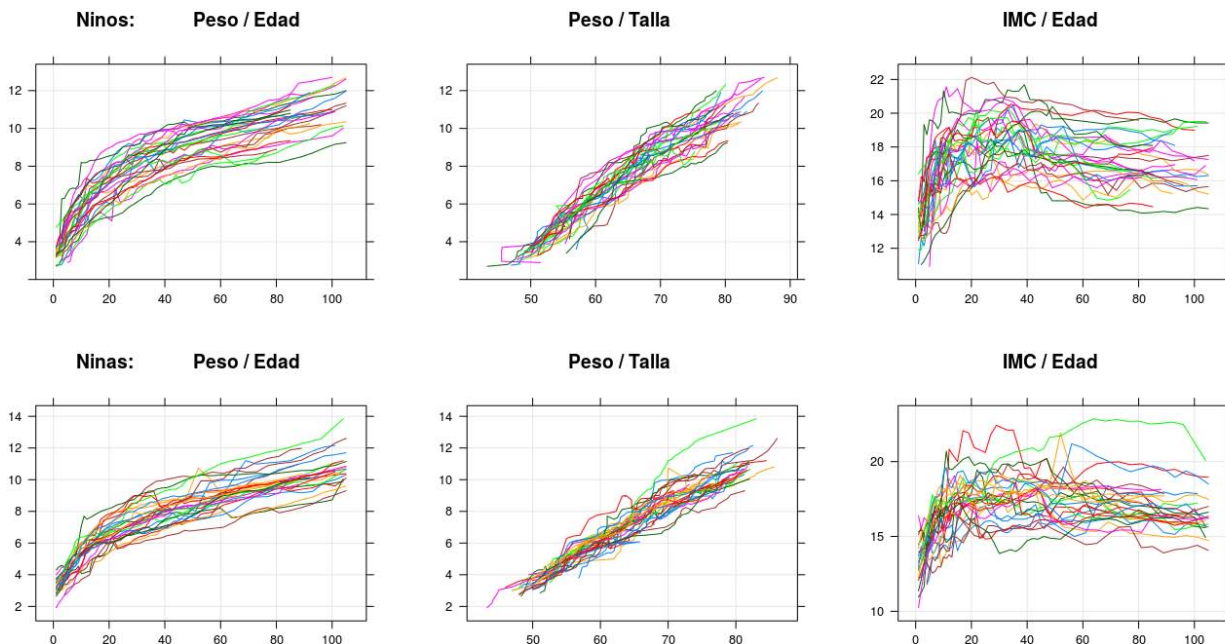


Figura 2. Gráficas de las medidas de peso para la edad, peso para la talla e índice de masa corporal (IMC) de cada uno de los niños y niñas, calculado por semana a lo largo del estudio. Cada infante está representado por un color diferente.

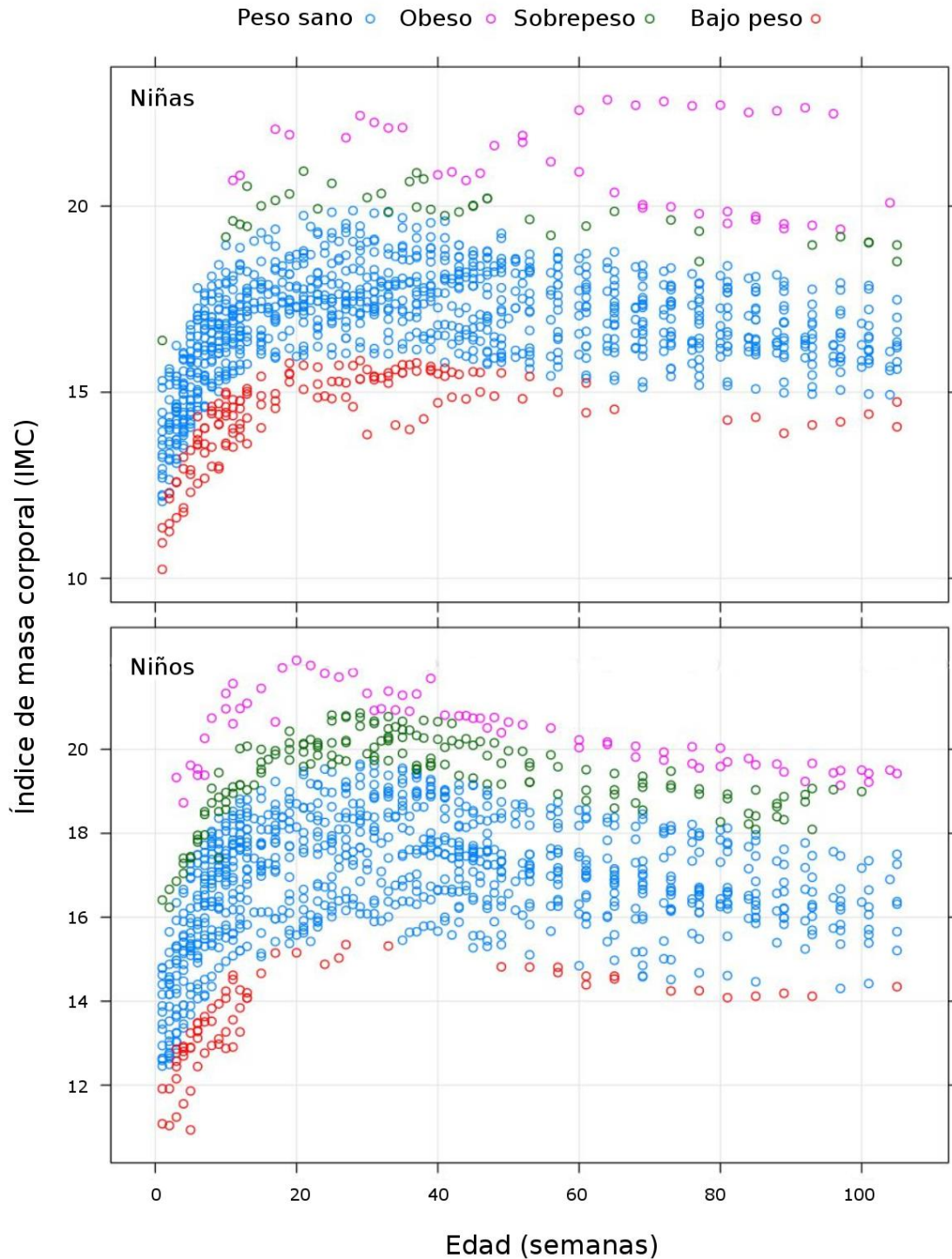


Figura 3. IMC por semana de cada niño y niña al momento de la toma de heces, y a lo largo de los dos años de seguimiento. Los puntos corresponden con el muestreo de heces, mostrando de acuerdo a los percentiles, la condición de bajo peso, peso normal, sobrepeso y obesidad del infante. Una mayoría se encuentra en peso normal con ligeras diferencias entre niños y niñas.

Como ya se mencionó, para explorar la estructura poblacional de la microbiota, seleccionamos 10 binomios con muestreo completo y definimos 8 diferentes tiempos (edades) para hacer el seguimiento de los infantes (figura 4). En los casos en los que no fue posible obtener la muestra exactamente a la edad definida, se utilizó la muestra de heces más cercana que hubiera en el muestreo para ese niño o niña, procurando obtener en lo posible al menos 8 tiempos por infante.

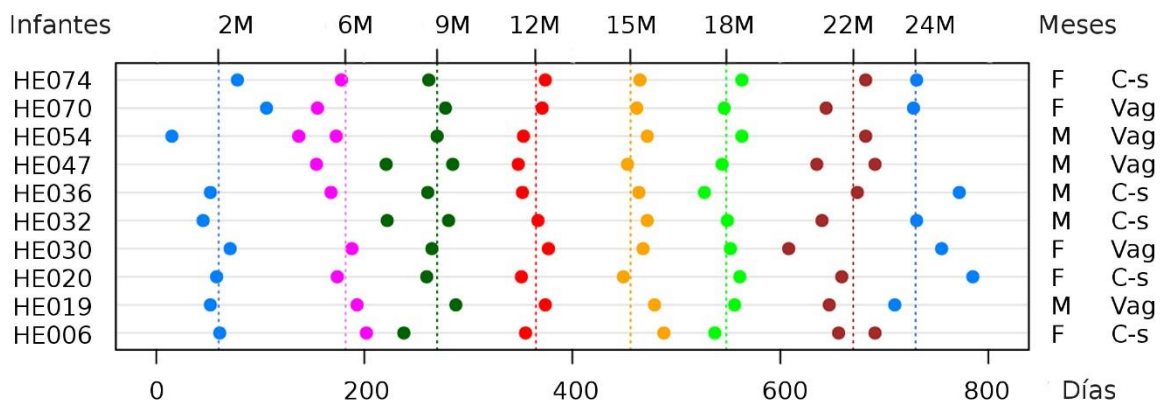


Figura 4. Intervalos de tiempo establecidos para realizar el seguimiento de la microbiota en las muestras de heces de los 10 infantes seleccionados. Se muestran los intervalos o categorías de edad con líneas punteadas y en distinto color, señalando tipo de alumbramiento (cesárea o parto), género, seguimiento del infante y su edad en días. Existe ligera variación en la edad a la que se obtiene la muestra dentro de cada intervalo. Las categorías de edad son 2, 6, 9, 12, 15, 18, 22 y 24 meses, lo que corresponde a 58, 174, 264, 361, 467 y 551 días, respectivamente. F niña, M niño; C-s cesárea, Vag nacimiento por vía vaginal.

Análisis primario de los datos de la secuenciación

Las lecturas pareadas una vez ensambladas resultaron en secuencias de aproximadamente ~250 pb de longitud (SD = 15.2, mínimo=150, ~50 pb de solapamiento), y después del filtrado por calidad se obtuvo un total de 2,507,261 lecturas de muy buena calidad (97,84%) para ser analizadas (figura 5).

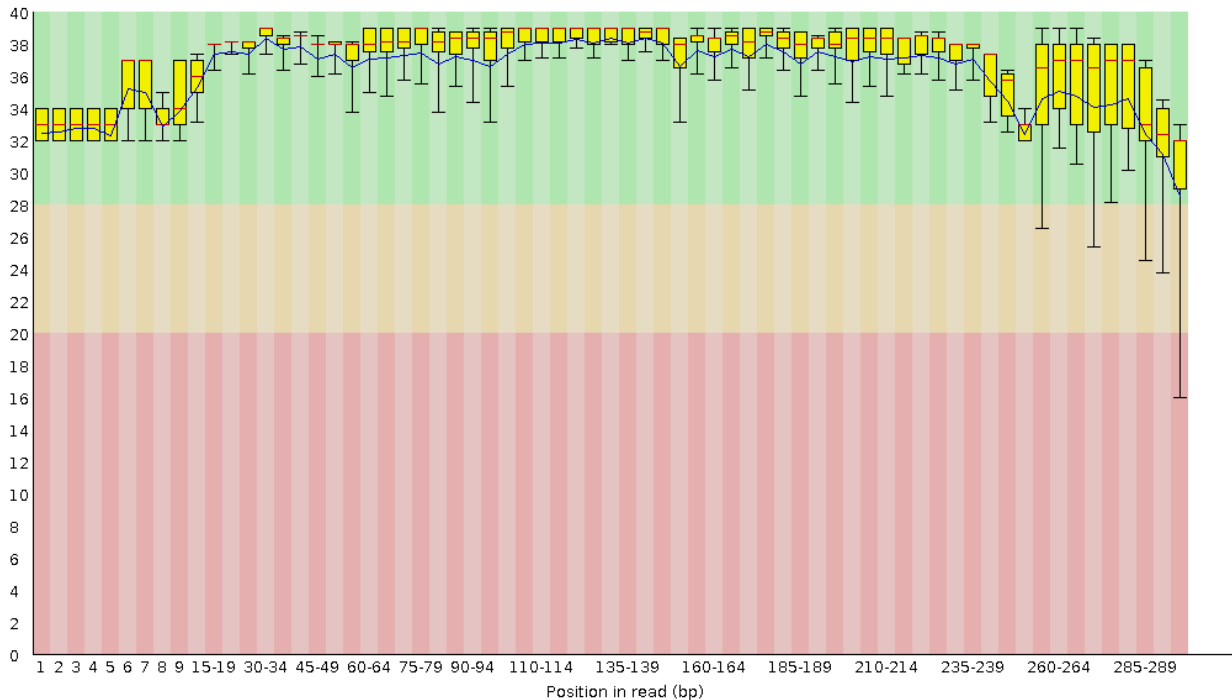


Figura 5. Calidad de las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva NGS después de haber realizado el análisis primario de los datos. Se observa que la mayoría de las bases secuenciadas caen por arriba de Q28 (región verde), esto significa una muy buena calidad en los datos. En el eje Y están los valores de calidad (Q2 a Q40), y en el eje X se muestra la posición (en nucleótidos) de todas las lecturas pareadas ya ensambladas.

Construcción de las OTUs y asignación taxonómica

Primero, se exploró la distribución de la profundidad de secuenciación por muestra. La profundidad de secuenciación por muestra resultó variable, en promedio se obtuvieron ~30,000 lecturas por muestra (figura 6). En el análisis con QIIME, asignamos un valor límite de 33,342 lecturas para realizar el análisis de rarefacción, descartando un total de 8 muestras: 3 muestras que corresponden a las mamás, una de las cuales sólo recuperó 99 lecturas (E032) y otra (E006) cuya microbiota resultó totalmente atípica (no mostrado); y 5 muestras de los infantes, de las cuales sólo dos

muestras correspondieron a un mismo tiempo (6 meses). La muestra del infante con mayor profundidad alcanzó las 0.2 millones de lecturas (HE074 a los 12 meses).

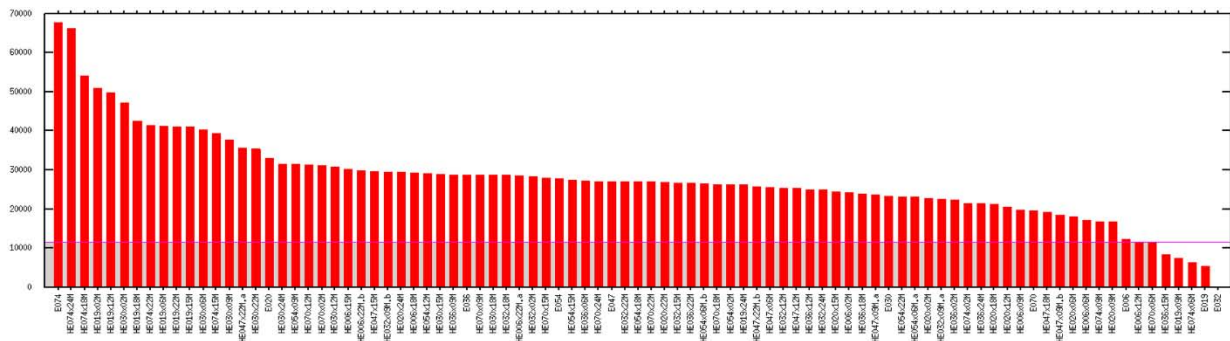


Figura 6. Distribución de la profundidad de secuenciación por muestra.

Utilizando el software MICCA (no mostrado) tampoco se observa una distribución homogénea de la cantidad de lecturas por muestra, lo cual era esperado. La muestra del infante con la cantidad más pobre de datos (HE074 a los 6 meses) presentó 6,090 lecturas, por lo que se definió ese valor límite de 6,090 lecturas para realizar el análisis de la diversidad. Usando este valor se descartaron sólo dos muestras de las madres, pero se incluyeron todos los infantes lo que permitió realizar adecuadamente el análisis de comparación entre la diversidad bacteriana de los infantes nacidos por cesárea vs aquellos nacidos por vía vaginal. La diferencia que obtuvimos de la cantidad de lecturas recuperadas con respecto a los resultados con QIIME, se debió a que en el pipeline de MICCA se realiza también la unión de las lecturas pareadas. Ambas estrategias son congruentes y consistentes, por ejemplo, la muestra más pobre es la E032, en este caso con 51 lecturas y la de mayor abundancia de lecturas es la HE074 a los 12 meses, con 0.1 millones de lecturas. Las variaciones en la profundidad de la secuenciación por muestra, en ambos casos, pueden deberse

a procedimientos técnicos aparentemente no controlables, inherentes al procedimiento de amplificación, preparación de las bibliotecas o de la secuenciación.

Utilizando MICCA (referencia abierta) se obtuvo un total de 8,285 OTUs, de las cuales 1,268 (15.3%) son agrupaciones *de novo*. La construcción de las OTUs se hizo a partir de una identidad del 97%. Un total de 1,082 OTUs son identificadas a nivel de especie (13.1%) y 4,368 a nivel de género (52.7%). Es notorio que por encima de los taxa de familia se recuperó una proporción sustancial de OTUs (89.0%) (figura 7). Esta es la resolución que obtuvimos usando el marcador del gen 16S específicamente con nuestros datos. El uso de la región V3 y V4 del gen 16S permite explorar la diversidad y composición de las comunidades bacterianas a nivel de género o incluso a nivel de especie. Sin embargo, se observa una proporción de taxa a niveles taxonómicos inferiores notoriamente baja (por ejemplo, a nivel de especie). Por lo tanto, en el presente estudio no se está considerando para el análisis de la diversidad, una resolución por debajo del nivel de especie. Sin embargo, debemos señalar que es posible obtener datos a tal resolución, usando la tecnología de secuenciación (NGS del 16S) en la plataforma MiSeq de Illumina.

Porcentaje de OTUs a nivel (%) —X—

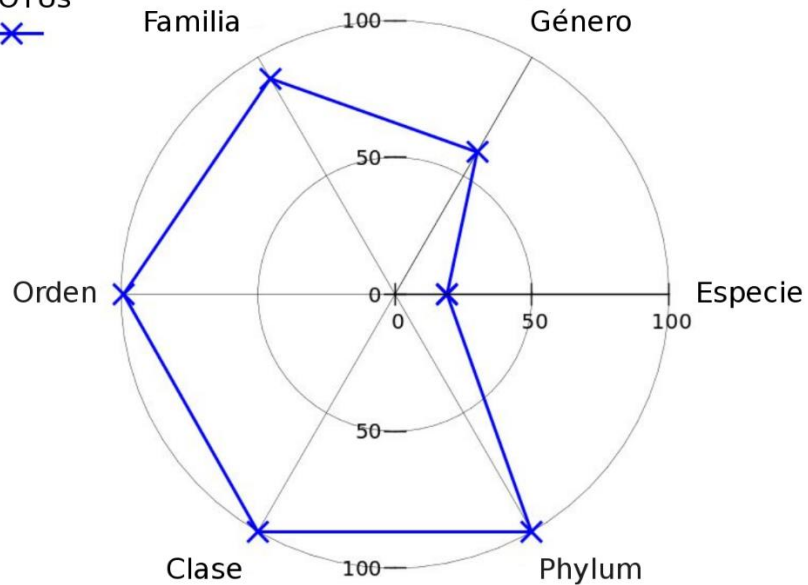


Figura 7. Asignación de las OTUs a diferentes niveles taxonómicos. Un total de 8265 OTUs + 20 OTUs no clasificadas se identificaron mediante el algoritmo de referencia abierta. Del total de las OTUs, a un nivel taxonómico específico, se identificaron: 1082 a nivel de especie (13.1%), 4348 a nivel de género (52.5%), 7354 a nivel de familia (88.8%), 8244 a nivel de orden (99.5%), 8263 a nivel de clase (99.7%) y 8265 a nivel de Phylum (99.8%).

Taxa más abundantes en los infantes nacidos por cesárea versus vía vaginal

La abundancia de los taxa presentes en la microbiota intestinal de los infantes muestra cambios graduales en sus proporciones a lo largo del estudio, lo cual es más evidente a nivel de los grandes grupos taxonómicos. Si se compara la dinámica de las poblaciones bacterianas en el transcurso del tiempo, considerando a toda la población de infantes y madres, se observa un cambio gradual hacia la composición que caracteriza la estructura poblacional observada en el adulto que, sin embargo, observamos que esta nunca se alcanza a los 2 años de edad (figura 8).

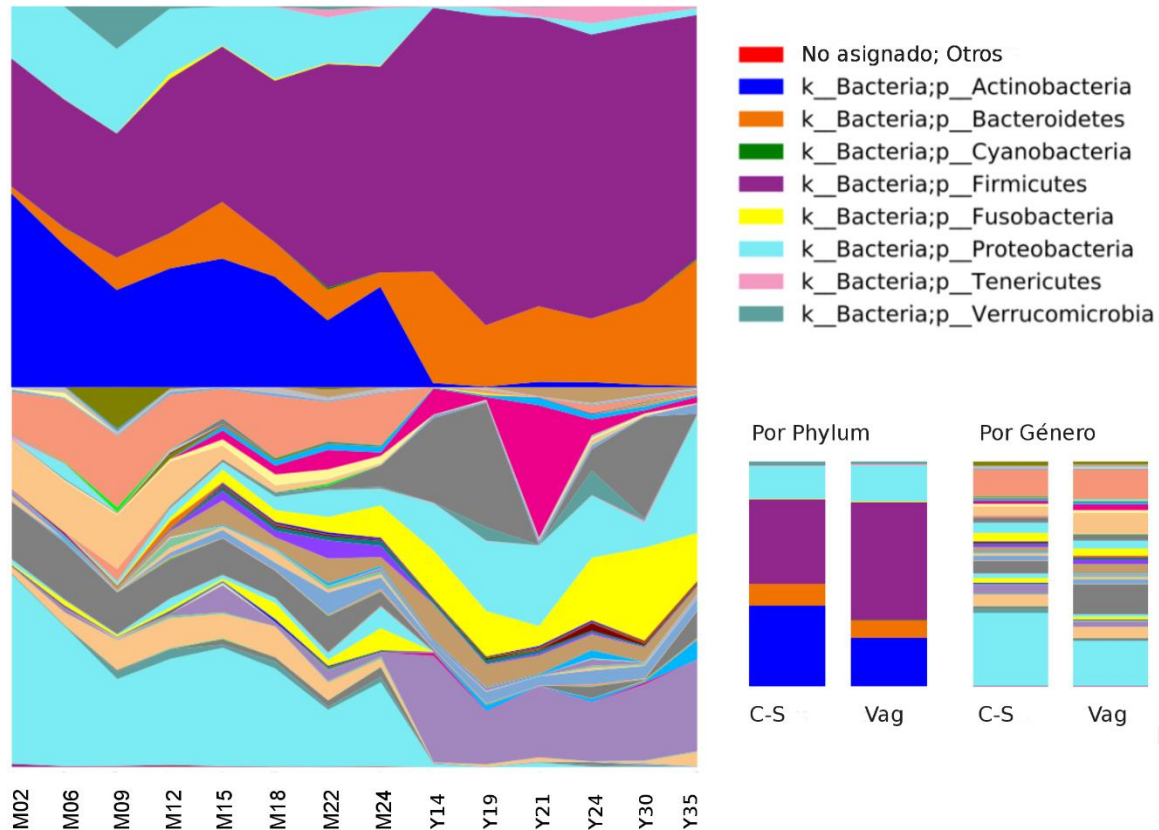


Figura 8. Evolución de la dinámica de la composición de bacterias a nivel de Phylum (arriba) y géneros (abajo) a lo largo de los dos primeros años de vida. En el gráfico se incluyen a las mamás Y14, Y19, Y21, Y24, Y30, Y35, las cuales están ordenadas de menor a mayor edad. M02, M06, M09, M12, M15, M18, M22 y M24 es la edad de los infantes en meses. Abajo a la derecha se muestran las diferencias observadas por tipo de alumbramiento (C-S, cesárea; Vag, parto vía vaginal).

Los grupos predominantes en las primeras etapas de vida de los infantes son las Actinobacteria y los Firmicutes, las primeras con un mayor predominio en los infantes nacido por cesárea. Las Actinobacteria, prácticamente están ausentes en las mamás (figura 8). En los infantes nacidos por parto la mayor abundancia está dada por los Firmicutes, el cual es un grupo que gradualmente va aumentando su abundancia y se vuelve el grupo predominante en la etapa adulta. En las madres se observa claramente que los Firmicutes conforman el grupo más abundante de la

microbiota intestinal y en segundo lugar están los Bacteroidetes. Por otra parte, las Proteobacteria son el tercer grupo más importante en todos los infantes y su dinámica de colonización es inversamente proporcional a lo observado con el grupo de los Bacteroidetes. Por ejemplo, observamos que la abundancia de las Proteobacteria en las madres es marginal y en cambio los Bacteroidetes conforman el segundo grupo más importante de la microbiota intestinal del adulto (figura 8).

La composición a nivel de géneros al parecer es mucho más variable y diversa, observamos cambios drásticos en la abundancia de géneros particulares, tanto en los infantes como en las madres (figura 8). La mayor diversidad es atribuida a los Firmicutes, no así debida a las Actinobacterias en donde el género *Bifidobacterium* es dominante. Al hacer la comparación entre los bebés nacidos por cesárea versus parto no se observaron marcadas diferencias entre Bacteroidetes y Proteobacteria. Sin embargo, al explorar con detalle la dinámica de colonización a los 2 y 6 meses de edad, observamos que la abundancia de los Bacteroidetes es marginal, más notorio en los infantes nacidos por parto (figura 9). También, en este grupo de infantes observamos que las Proteobacteria tienen una importante presencia en el primer año de vida, mientras que en el segundo año su abundancia se ve disminuida (figura 9). Por otra parte, las Actinobacteria son el grupo dominante en las muestras de infantes nacidos por cesárea, y su abundancia va disminuyendo, pero no alcanza los niveles tan bajos que observamos en los bebés nacidos por parto.

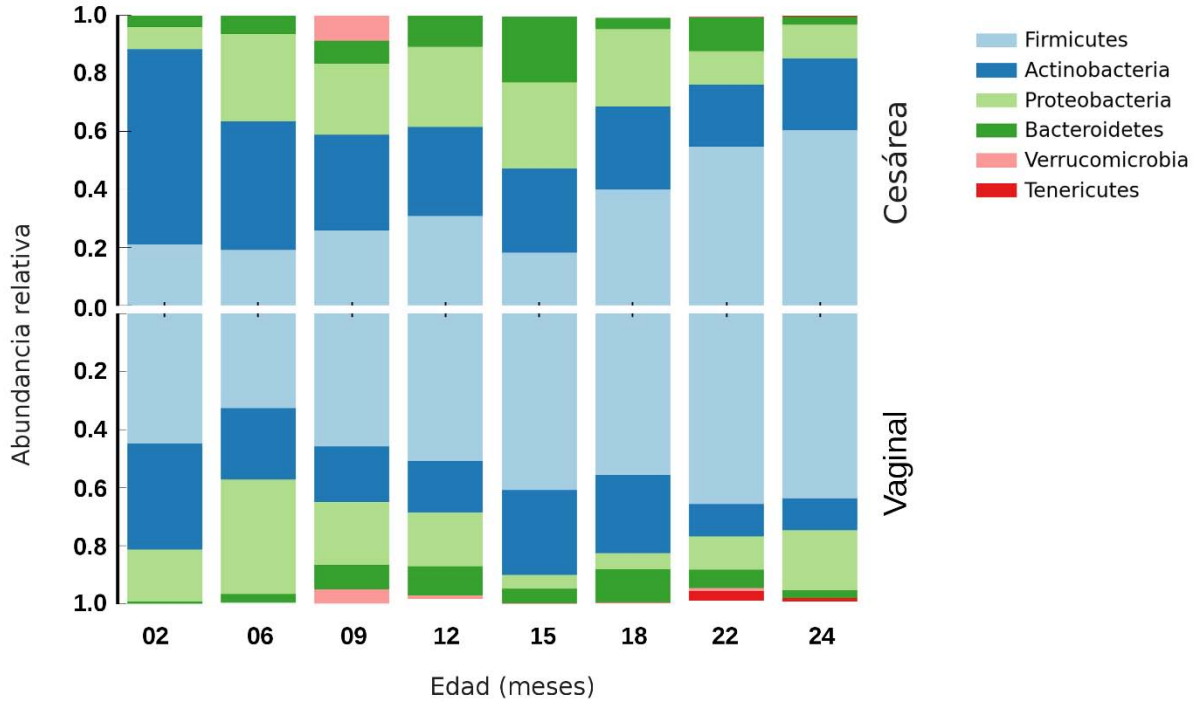


Figura 9. Evolución de la dinámica de la composición de bacterias a nivel de Phylum de los infantes considerando el tiempo de seguimiento desde los 2 hasta los 24 meses de edad. Se comparan las abundancias relativas de los grupos nacidos por vía quirúrgica vs parto normal.

Para identificar los géneros o especies más abundantes y prevalentes en las poblaciones se ordenaron, de mayor a menor abundancia, los taxa presentes en todas las muestras del estudio en cada intervalo de tiempo. Se identificaron los primeros 20 taxa más abundantes (*top20*) en cada categoría de edad (figura 10).

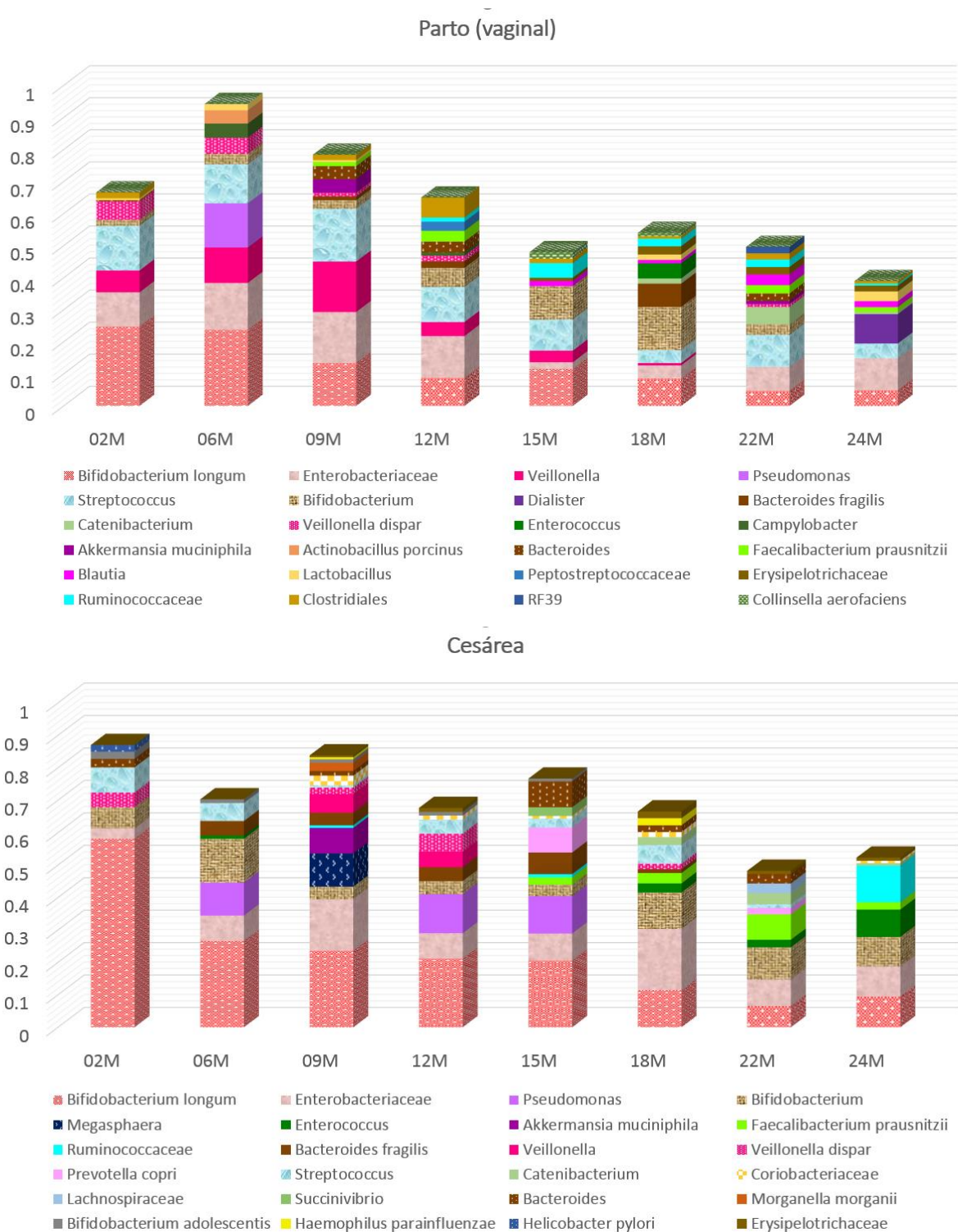
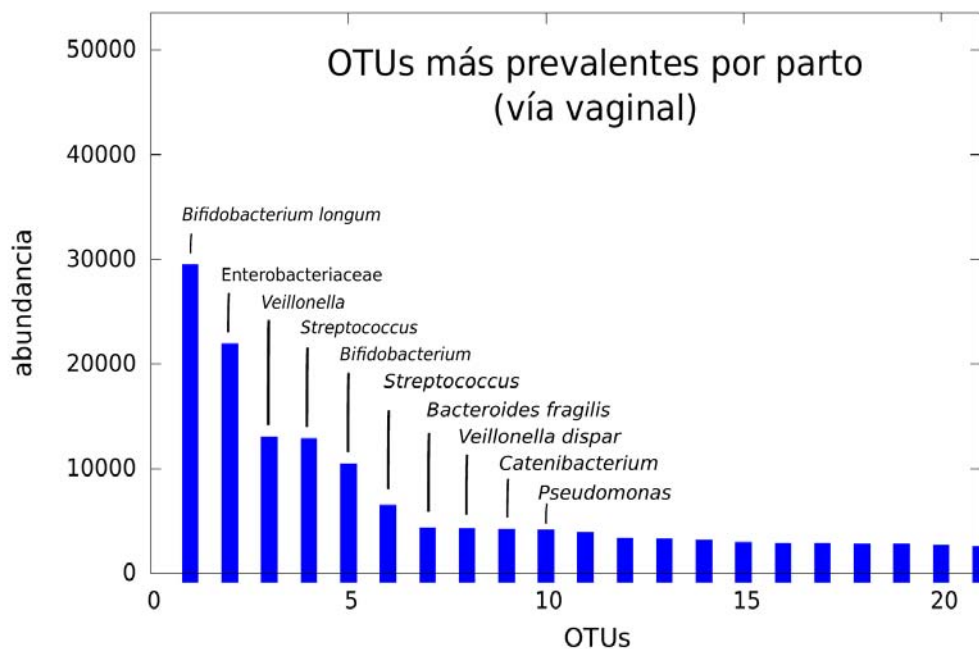


Figura 10. Distribución comparativa de las abundancias relativas de los taxa *top20*, a diferentes tiempos después del nacimiento en los dos grupos de infantes estudiados.

A pesar de que existe un predominio evidente de ciertas taxa particulares, la microbiota es variable en el tiempo, por lo que no se mantienen siempre las mismas proporciones de los grupos bacterianos durante el desarrollo del niño. Al sumar los *top20* que observamos en cada uno de los intervalos de edad (figura 10), para el caso de los infantes nacidos por cesárea, se obtiene un total de 77 OTUs diferentes. De estas, los 10 taxa más prevalentes (presentes en al menos 4 intervalos de tiempo) son *Bifidobacterium* (presente en 8, 6 ó 4 tiempos), Enterobacteriaceae (8), *Streptococcus* (5), *Bifidobacterium adolescentis* (5), *Bacteroides fragilis* (5), *Faecalibacterium prausnitzii* (4) y Coriobacteriaceae (4). Por otro lado, al sumar los *top20* para el caso de los infantes nacidos por vía vaginal, se obtiene un total de 74 OTUs diferentes, de las cuales los 10 taxa más prevalentes corresponden con *Streptococcus* (8), *Bifidobacterium longum* (8), Enterobacteriaceae (8), *Bifidobacterium* (6 y 4), *Veillonella* (6), *Streptococcus* (5 y 4), *Veillonella dispar* (5), Erysipelotrichaceae (4), *Catenibacterium* (4) y *Blautia* (4). Se observó además que existe una mayor diversidad de taxa en los infantes nacidos por vía vaginal, aparejado con una menor dominancia de un solo taxa, en comparación con lo observado en los infantes nacidos por cesárea (figura 10 y 11).

a)



b)

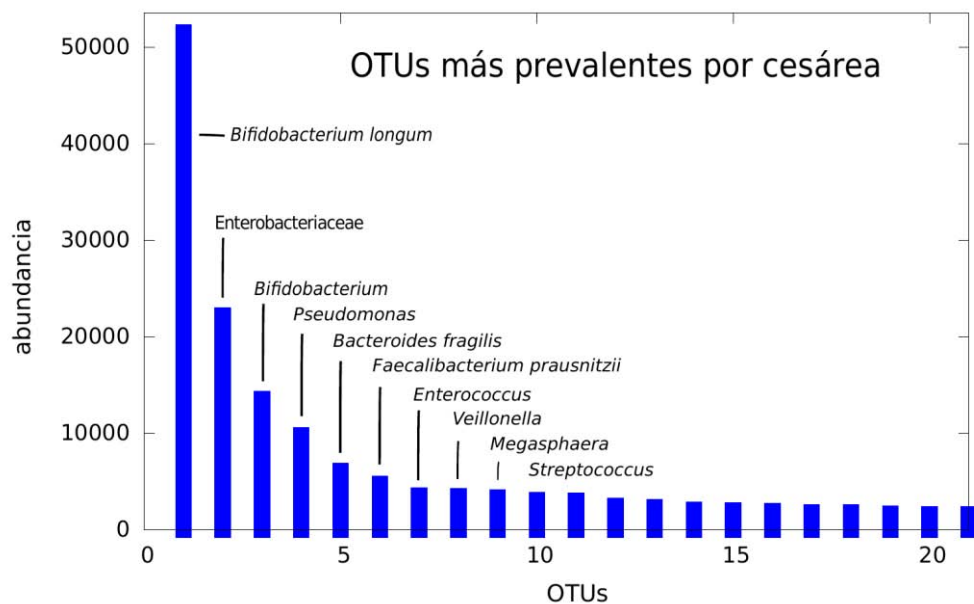


Figura 11. OTUs más prevalentes en los infantes nacidos por a) vía vaginal y b) cesárea. Se suman las abundancias absolutas de todas las OTUs (presentes en todos los intervalos de tiempo) ordenándolas de mayor a menor abundancia. Se muestra sólo el nombre de los primeros 10 taxa.

A nivel de familia, el taxón más abundante en los primeros meses de edad en los infantes nacidos por cesárea y en los nacidos por vía vaginal es la familia Bifidobacteriaceae, seguido de Veillonellaceae y Streptococaceae, estos últimos taxa pertenecientes al Phylum Firmicutes (figura 12a), así como las Enterobacteriaceae. Además, es evidente que la diversidad y composición de la microbiota intestinal está dominada por taxa muy particulares dentro de los grupos filogenéticos predominantes, los cuales son a nivel de Phylum Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes y Verrucomicrobia. Se observa también que en los infantes nacidos por cesárea, las Bifidobacteriaceae son las bacterias que presentan la mayor abundancia y predominan comparativamente sobre todas las demás. Por otro lado, a los 24 meses de edad se observa que aumenta la diversidad bacteriana de los infantes, encontrando una mayor abundancia de las familias Ruminococcaceae, Enterobacteriaceae, Veillonellaceae, Enterococcaceae, Lachnospiraceae, Streptococcaceae, Erysipelotrichaceae, Lactobacillaceae, y otras más (figura 12b). Asimismo, algunos taxa de bacterias que están presentes en los infantes nacidos por vía vaginal están ausentes en los infantes nacidos por cesárea, y de forma contraria hay taxa que sólo están presentes en los infantes nacidos por cesárea (figura 12a y 12b).

a)

- A: Bacteroidaceae
- B: Coriobacteriia
- C: Micrococcaceae
- D: Bifidobacteriaceae
- E: Erysipelotrichaceae
- F: Lachnospiraceae
- G: Clostridiaceae
- H: Veillonellaceae
- I: Streptococcaceae
- J: Lactobacillaceae
- K: Enterococcaceae
- L: Pasteurellaceae
- M: Aeromonadaceae
- N: Enterobacteriaceae
- O: Pseudomonadaceae
- P: Helicobacteraceae

- Cesárea
- Parto

Microbiota intestinal a los 2 meses

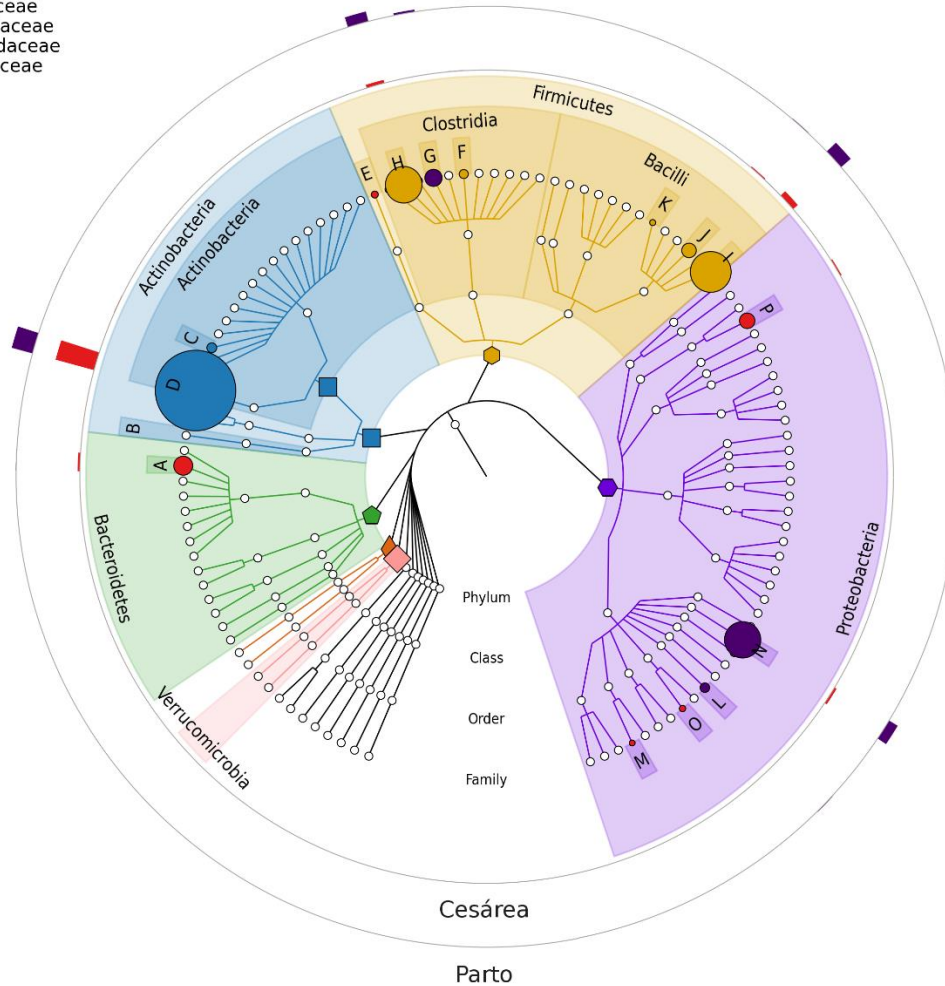


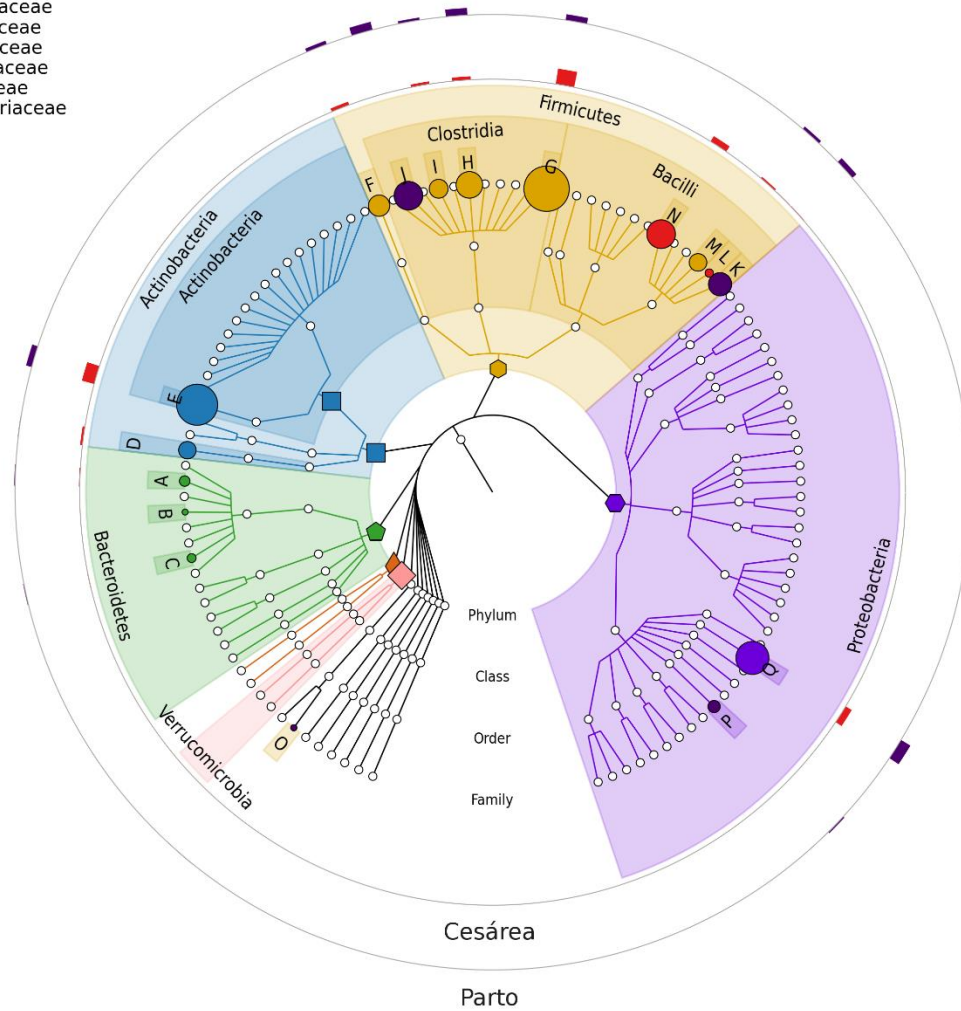
Figura 12. Diferencias en la diversidad de la microbiota intestinal entre los niños nacidos por cesárea vs parto, a) a los 2 meses, y b) a los 24 meses. Se observa la distribución filogenética y abundancia de los taxa a nivel de familia. Las hojas (nodos terminales) del árbol representan las familias, el diámetro es proporcional a la abundancia relativa (número de OTUs), el color está dado según el Phylum y se representa en color sólido cuando la abundancia es mayor a 100 OTUs (~0.5% en términos de abundancia relativa). Los círculos externos muestran, de adentro hacia afuera, la abundancia de los taxa en los infantes nacidos por cesárea (rojo) y los nacidos por vía vaginal (morado).

b)

- A: Bacteroidaceae
- B: Porphyromonadaceae
- C: Prevotellaceae
- D: Coriobacteriia
- E: Bifidobacteriaceae
- F: Erysipelotrichaceae
- G: Ruminococcaceae
- H: Lachnospiraceae
- I: Clostridiaceae
- J: Veillonellaceae
- K: Streptococcaceae
- L: Leuconostocaceae
- M: Lactobacillaceae
- N: Enterococcaceae
- O: Fusobacteriaceae
- P: Pasteurellaceae
- Q: Enterobacteriaceae

- Cesárea
- Parto

Microbiota intestinal a los 24 meses



Diversidad de la microbiota entre los grupos

A partir de las curvas de rarefacción observamos que la diversidad bacteriana aumenta conforme aumenta la edad, separando claramente las muestras de las mamás con respecto a las muestras de los infantes (figura 13 y 14).

Diversidad alfa a distinta profundidad de rarefacción

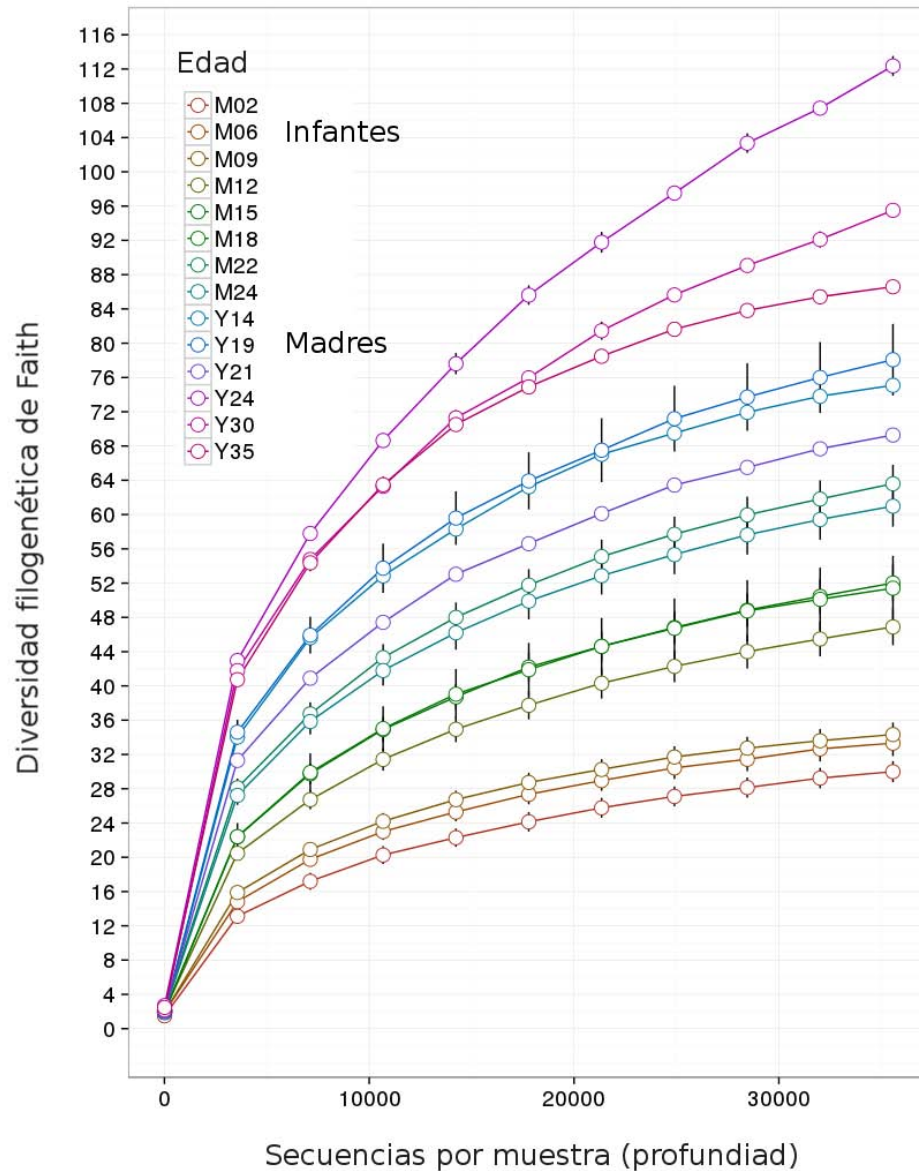


Figura 13. Curvas de rarefacción de la diversidad alfa de todas las muestras incluyendo a las madres.

En cuanto a la cantidad de OTUs observadas y el índice de diversidad de Simpson, no se identificaron diferencias claras entre las muestras de los infantes nacidos por cesárea versus parto, aunque existe una ligera tendencia que apunta a que las muestras por cesárea presentan una menor diversidad de taxa, en comparación con las muestras de los infantes nacidos por vía vaginal, las cuales son más diversas. Estas posibles diferencias no se observan a los 24 meses de edad (figura 14), lo cual coincide con el análisis de componentes principales, en donde se aprecia que no hay diferencias notorias de las microbiotas considerando el tipo de nacimiento, pero si se observa una evolución gradual aparejada con el tipo de alimentación de los infantes (anexo 3 y 4).

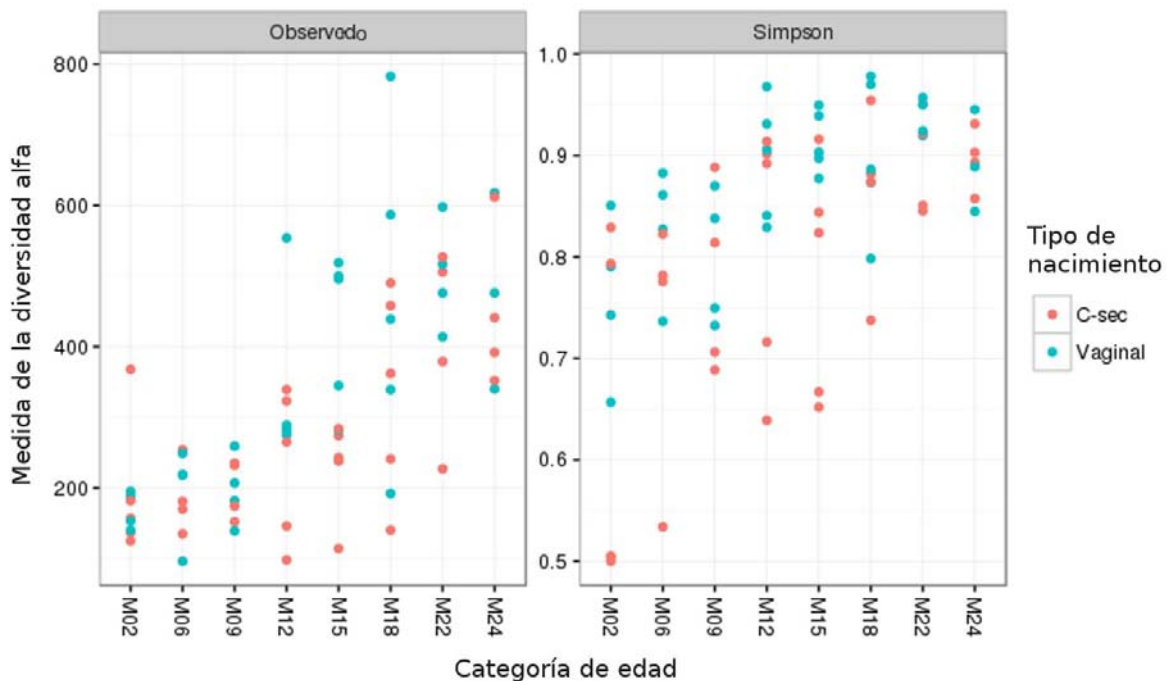


Figura 14. Medidas de la diversidad alfa de las comunidades bacterianas en los infantes nacidos por cesárea (rojo) vs parto (azul) a lo largo del seguimiento. A la izquierda se muestra el número de OTUs observadas, a la derecha el índice de diversidad de Simpson, el cual considera el peso de los taxa dominantes.

DISCUSIÓN

Existe un patrón diferente de la estructura de la microbiota intestinal entre los infantes nacidos por cesárea versus vía vaginal. Aparentemente, y a pesar de las discrepancias observadas entre los resultados de diferentes autores, está generalmente aceptado que existe un retraso o ausencia del género *Bacteroides* en los infantes nacidos por cesárea durante su primer año de vida, así como también una menor abundancia de *Escherichia-Shigella* a los cuatro meses de edad (Azad et al., 2013; Lee et al., 2016). En algunos estudios realizados en países en vías de desarrollo los infantes nacidos por cesárea muestran una colonización del intestino muy temprana debida al género *Bacteroides*. Esto se ha atribuido a la gran distribución de esta bacteria fecal en el medio ambiente de los niños en condiciones de pobreza (Kreader, 1995; Odagiri et al., 2015). Además, se ha encontrado que existe una colonización temprana del grupo de las Enterobacteriaceae y una mayor diversidad bacteriana en niños nacidos por vía vaginal en países industrializados (Adlerberth et al., 1991). Sin embargo, la relación que existe entre esos patrones de colonización y la forma del nacimiento, aún no está completamente esclarecida, y son pocos los trabajos realizados en países no desarrollados o en las comunidades rurales.

Los resultados que obtuvimos muestran que, en efecto, existen diferencias en la estructura de las comunidades bacterianas de infantes nacidos por cesárea versus vía vaginal. Estos datos apoyan lo publicado previamente en el sentido de que los niños que nacen por cesárea muestran una menor diversidad bacteriana (figuras 10 y 14) (Azad et al., 2013; Lee et al., 2016). Algunos autores han reportado dominancia

del género *Bifidobacterium* independientemente de la vía de nacimiento, pero otros autores han reportado una abundancia mayor a los seis meses en los infantes nacidos por vía vaginal (Azad et al., 2013). En nuestro caso, encontramos que *Bifidobacterium* es el género dominante (figura 11), lo cual se relaciona con una menor presencia de otros grupos taxonómicos. Este comportamiento es más notorio en los infantes que nacieron por vía quirúrgica y concuerda con lo reportado en cuanto a que existe una correlación negativa entre *Bifidobacterium* y la diversidad bacteriana. Otros estudios han mostrado que existe un retraso en la colonización por *Bifidobacterium*, por ejemplo, a los 30 días de edad en infantes nacidos por cesárea. En el caso de *Bacteroides fragilis* el retraso que se observa puede prolongarse hasta los seis meses de edad (Grönlund et al., 1999). En nuestros resultados, observamos que existe un retraso en la colonización por *Veillonella* en los infantes nacidos por cesárea en los primeros 2 y 6 meses de edad, no habiendo retraso alguno para el caso del género *Bacteroides* (figura 10).

A nivel del Phylum Firmicutes, hay trabajos en donde no se hallaron diferencias entre los infantes nacidos por vía vaginal versus cesárea. En cambio, otros estudios muestran una mayor abundancia de Firmicutes en los infantes nacidos por cesárea, comparativamente con respecto a la colonización por Bacteroidetes, lo cual también puede deberse a que la madre haya recibido tratamiento con antibióticos antes, durante o después del alumbramiento. Una alta predominancia de especies como *Clostridium difficile* es un factor de riesgo severo para las infecciones gastrointestinales en la infancia, asociado en mayor medida a la vía quirúrgica. En nuestra población de estudio observamos marcadas diferencias con respecto a los Firmicutes. La abundancia de este grupo se observó disminuida en los infantes nacidos por cesárea

(figura 9). Sin embargo, estas diferencias ya no son tan evidentes después de los 18 meses de edad. Las familias Veillonellaceae y Streptococcaceae se notan disminuidas a los 2 meses de edad y en mayor intensidad a los 24 meses (figura 12). Esto indica que el aumento en la abundancia de los Firmicutes en los infantes nacidos por cesárea obedece a un aumento en la abundancia de otras familias que se establecen e incrementan su presencia a los 2 años de edad.

No se han observado diferencias entre ambos tipos de nacimiento en cuanto a la diversidad dentro del Phylum Proteobacteria. En los estudios microbiológicos observamos que los niños nacidos por cesárea estaban colonizados por *Haemophilus*, *Veillonella*, Clostridiaceae y *Klebsiella* (Hesla et al., 2014; Jakobsson et al., 2014; Liu et al., 2015). Al parecer dentro de la familia Enterobacteriaceae la colonización es independiente de la forma de nacimiento. En cuatro diferentes estudios se reportó que, a los tres meses, el grupo *Bacteroides-Prevotella* es el más prevalentes en infantes nacidos por vía vaginal (Kabeerdoss et al., 2013). Nosotros encontramos que a los dos meses se observa una menor abundancia de las Enterobacteriaceae en los infantes nacidos por cesárea (figura 12a). Esto sugiere un retraso en la colonización de las enterobacterias en los infantes nacidos por cesárea, lo cual coincide con otros estudios y se ha relacionado con el papel que tiene la exposición al medio ambiente en el proceso de colonización (Adlerberth et al., 2006).

A los seis meses la familia Enterobacteriaceae parece no estar afectada por la forma de nacimiento de acuerdo con algunos autores (Kabeerdoss et al., 2013). También se ha observado un retardo en la colonización de *Bacteroides* en los infantes nacidos por cesárea a esta edad (Jakobsson et al., 2014). Nuestros resultados

muestran una mayor abundancia relativa de las enterobacterias en los infantes nacidos por vía vaginal desde los primeros meses de vida (figura 10).

Estudios de infantes al primer año de vida han reportado que la diversidad de Bacteroidetes y Firmicutes es mucho más baja en infantes nacidos por cesárea y las diferencias muestran ser estadísticamente significativas (Jakobsson et al., 2014). En nuestro estudio no se observan diferencias en la abundancia de los Bacteroidetes, las diferencias se hallan en las proporciones de la abundancia relativa de los Firmicutes y de las Actinobacteria (figura 10).

A los 15 meses se pierden muchas de las diferencias importantes que observamos durante el primer año de vida de los infantes. A los 22 y 24 meses no hay diferencias en cuanto a la abundancia de los Bacteroidetes ni de los Firmicutes, en la comparación entre infantes nacidos por cesárea versus parto. Sin embargo, a esta edad notamos la presencia del Phylum Firmicutes en los infantes nacidos por vía vaginal (figura 8). Sin embargo, pareciera que, a partir del primer año de vida o año y medio, la abundancia y diversidad de filos y géneros específicos deja de estar influenciada por la forma de nacimiento.

CONCLUSIONES

Se observaron diferencias en la composición y dinámica de colonización de la microbiota intestinal, así como en la abundancia relativa de taxa particulares en los infantes, principalmente durante el primer año de vida y con respecto al tipo de alumbramiento: quirúrgico versus vía vaginal. Las diferencias a nivel de los principales taxa se pierden con la edad, no así a nivel de géneros. La predominancia de *Bifidobacterium longum* se asoció a una menor diversidad bacteriana. Se sabe que esta bacteria promueve el desarrollo y maduración del sistema inmunológico en el humano y contribuyen de forma importante a la digestión y asimilación de los nutrientes provenientes de la leche materna. Las diferencias a niveles taxonómicos inferiores, por ejemplo, a nivel de género, y con respecto a otros trabajos, probablemente se deban a cuestiones sociodemográficas particulares que tiene que ver con las condiciones de vida y los elementos culturales de la comunidad.

Explorar el impacto que puedan tener estos patrones de colonización en estas comunidades y sus efectos a largo plazo, permitirá tener una mejor comprensión del microbioma intestinal en el humano y su papel como factor de riesgo en la salud, en poblaciones tanto rurales como urbanas. La comunidad en donde se desarrolló este trabajo, se encuentra a unos 200 km de la Ciudad de México, sin embargo, sus particularidades la hacen una población de riesgo por la exposición tan alta a fuentes de patógenos intestinales bacterianos y parasitarios. Xoxocotla se asemejan más a una comunidad rural que a la de una suburbana. Esta población tiene una alta tasa de nacimientos por cesárea, en algunos casos no justificada desde el punto de vista

médico, como lo indican las cifras de la frecuencia de nacimientos por cesáreas en nuestro país (casi del 50%). Y más del 25% de los embarazos se dan en adolescentes menores de 18 años.

Con base en los resultados obtenidos y en la discusión de la literatura relacionada, sería muy interesante hacer estudios futuros, con más observaciones o enfocar los análisis a grupos de bacterias particulares y en relación con sus funciones metabólicas. Esto, a fin de hacer un análisis de correlación más robusto que se complemente con lo reportado en este trabajo. El número de binomios madre-hijo que se incluyó, dependió de la disponibilidad de los recursos financieros necesarios para realizar la secuenciación masiva, la cual es costosa, sin embargo, la profundidad de los datos es mayor a la de otros trabajos, la información obtenida es novedosa y nos permite plantear hipótesis interesantes.

Finalmente, es de mencionar que, hasta la fecha, no se ha reportado un estudio similar en comunidades marginadas, con características sociodemográficas rurales, que haga un seguimiento de una cohorte de infantes desde el nacimiento hasta los dos años de edad y que contraste el tipo de nacimiento, como el que se presenta. Esto tiene una gran importancia en México, al describir una población sana que servirá de referencia en la comparación con estudios futuros.

LITERATURA CITADA

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., and Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* 6, 237ra65.
- Adlerberth, I., Carlsson, B., de Man, P., Jalil, F., Khan, S. R., Larsson, P., et al. (1991). Intestinal colonization with Enterobacteriaceae in Pakistani and Swedish hospital-delivered infants. *Acta Paediatr. Scand.* 80, 602–610.
- Adlerberth, I., Lindberg, E., Aberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegård, I.-L., et al. (2006). Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? *Pediatr. Res.* 59, 96–101.
- Albanese, D., Fontana, P., De Filippo, C., Cavalieri, D., and Donati, C. (2015). MICCA: a complete and accurate software for taxonomic profiling of metagenomic data. *Sci. Rep.* 5, 9743.
- Aronesty, E., and Erik, A. (2013). Comparison of Sequencing Utility Programs. *Open Bioinforma. J.* 7, 1–8.
- Asnicar, F., Weingart, G., Tickle, T. L., Huttenhower, C., and Segata, N. (2015). Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn. *PeerJ* 3, e1029.
- Aujoulat, F., Roudière, L., Picaud, J.-C., Jacquot, A., Filleron, A., Neveu, D., et al. (2014). Temporal dynamics of the very premature infant gut dominant microbiota. *BMC Microbiol.* 14, 325.
- Azad, M. B., Konya, T., Maughan, H., Guttman, D. S., Field, C. J., Chari, R. S., et al. (2013). Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ* 185, 385–394.
- Bager, P., Wohlfahrt, J., and Westergaard, T. (2008). Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. *Clin. Exp. Allergy* 38, 634–642.
- Bauer, K. C., Huus, K. E., and Brett Finlay, B. (2016). Microbes and the mind: emerging hallmarks of the gut microbiota-brain axis. *Cell. Microbiol.* 18, 632–644.
- Bernstein, C. N., Banerjee, A., Targownik, L. E., Singh, H., Ghia, J. E., Burchill, C., et al. (2016). Cesarean Section Delivery Is Not a Risk Factor for Development of Inflammatory Bowel Disease: A Population-based Analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 50–57.
- Biasucci, G., Rubini, M., Riboni, S., Morelli, L., Bessi, E., and Retetangos, C. (2010).

- Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum. Dev.* 86 Suppl 1, 13–15.
- Blaser, M. J., and Falkow, S. (2009). What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 887–894.
- Cao, L., and Yu, J. (2015). Effect of *Helicobacter pylori* Infection on the Composition of Gastric Microbiota in the Development of Gastric Cancer. *Gastrointest Tumors* 2, 14–25.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- Cho, I., Ilseung, C., and Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* doi:10.1038/nrg3182.
- Coggins, S. A., Wynn, J. L., and Weitkamp, J.-H. (2015). Infectious causes of necrotizing enterocolitis. *Clin. Perinatol.* 42, 133–54, ix.
- Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., and Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci. Rep.* 6, 23129.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., et al. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069–5072.
- Dethlefsen, L., Les, D., Eckburg, P. B., Bik, E. M., and Relman, D. A. (2006). Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol. Evol.* 21, 517–523.
- Dixon, P., and Philip, D. (2003). VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Veg. Sci.* 14, 927.
- Dogra, S., Shaillay, D., Olga, S., Shu-E, S., Catherine, N.-B., Brück, W. M., et al. (2015). Dynamics of Infant Gut Microbiota Are Influenced by Delivery Mode and Gestational Duration and Are Associated with Subsequent Adiposity. *MBio* 6, e02419–14.
- Faith, D. P. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol. Conserv.* 61, 1–10.
- Fung, T. C., Olson, C. A., and Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat. Neurosci.* 20, 145–155.
- Grönlund, M. M., Lehtonen, O. P., Eerola, E., and Kero, P. (1999). Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 28, 19–25.

- Guarner, F., Francisco, G., and Juan-R, M. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* 361, 512–519.
- Heredia-Pi, I., Servan-Mori, E. E., Wirtz, V. J., Avila-Burgos, L., and Lozano, R. (2014). Obstetric care and method of delivery in Mexico: results from the 2012 National Health and Nutrition Survey. *PLoS One* 9, e104166.
- Hesla, H. M., Stenius, F., Jäderlund, L., Nelson, R., Engstrand, L., Alm, J., et al. (2014). Impact of lifestyle on the gut microbiota of healthy infants and their mothers—the ALADDIN birth cohort. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 791–801.
- Hiergeist, A., Gläsner, J., Reischl, U., and Gessner, A. (2015). Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. *ILAR J.* 56, 228–240.
- Hillier, S. L., Nugent, R. P., Eschenbach, D. A., Krohn, M. A., Gibbs, R. S., Martin, D. H., et al. (1995). Association between Bacterial Vaginosis and Preterm Delivery of a Low-Birth-Weight Infant. *N. Engl. J. Med.* 333, 1737–1742.
- Hosny, A. E.-D. M. S., El-Khayat, W., Kashef, M. T., and Fakhry, M. N. (2017). Association between preterm labor and genitourinary tract infections caused by *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, Gram-negative bacilli, and coryneforms. *J. Chin. Med. Assoc.* doi:10.1016/j.jcma.2016.10.007.
- Huber, W., Carey, V. J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B. S., et al. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Methods* 12, 115–121.
- Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214.
- Jakobsson, H. E., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., et al. (2014). Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* 63, 559–566.
- Kabeerdoss, J., Ferdous, S., Balamurugan, R., Mechenro, J., Vidya, R., Santhanam, S., et al. (2013). Development of the gut microbiota in southern Indian infants from birth to 6 months: a molecular analysis. *J. Nutr. Sci.* 2, e18.
- Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L., and Gordon, J. I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474, 327–336.
- Kelly, J. R., Kennedy, P. J., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Clarke, G., and Hyland, N. P. (2015). Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 392.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and

- next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, e1.
- Kreader, C. A. (1995). Design and evaluation of Bacteroides DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1171–1179.
- Lau, J. T., Whelan, F. J., Herath, I., Lee, C. H., Collins, S. M., Bercik, P., et al. (2016). Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. *Genome Med.* 8, 72.
- Lee, E., Kim, B. J., Kang, M. J., Choi, K. Y., Cho, H. J., Kim, Y., et al. (2016). Dynamics of Gut Microbiota According to the Delivery Mode in Healthy Korean Infants. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 8, 471–477.
- Li, K., Bihan, M., Yooseph, S., and Methé, B. A. (2012). Analyses of the Microbial Diversity across the Human Microbiome. *PLoS One* 7, e32118.
- Liu, D., Yu, J., Li, L., Ai, Q., Feng, J., Song, C., et al. (2015). Bacterial community structure associated with elective cesarean section versus vaginal delivery in Chinese newborns. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 60, 240–246.
- Li, Y., Tian, Y., Zhu, W., Gong, J., Gu, L., Zhang, W., et al. (2014). Cesarean delivery and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Scand. J. Gastroenterol.* 49, 834–844.
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., and Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Med.* 8. doi:10.1186/s13073-016-0307-y.
- Mangiola, F., Ianiro, G., Franceschi, F., Faggioli, S., Gasbarrini, G., and Gasbarrini, A. (2016). Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J. Gastroenterol.* 22, 361–368.
- Mayer, E. A., Tillisch, K., and Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *J. Clin. Invest.* 125, 926–938.
- McMurdie, P. J., and Susan, H. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217.
- Navas-Molina, J. A., Peralta-Sánchez, J. M., González, A., McMurdie, P. J., Vázquez-Baeza, Y., Xu, Z., et al. (2013). Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods Enzymol.* 531, 371–444.
- Odagiri, M., Schriewer, A., Hanley, K., Wuertz, S., Misra, P. R., Panigrahi, P., et al. (2015). Validation of Bacteroidales quantitative PCR assays targeting human and animal fecal contamination in the public and domestic domains in India. *Sci. Total Environ.* 502, 462–470.

- Oświęćimska, J., Szymbal, A., Rocznik, W., Girczys-Poledniok, K., and Kwiecień, J. (2017). New insights into the pathogenesis and treatment of irritable bowel syndrome. *Adv. Med. Sci.* 62, 17–30.
- Palmer, C., Chana, P., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., and Brown, P. O. (2007). Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol.* 5, e177.
- Papathoma, E., Triga, M., Fouzas, S., and Dimitriou, G. (2016). Cesarean section delivery and development of food allergy and atopic dermatitis in early childhood. *Pediatr. Allergy Immunol.* 27, 419–424.
- Price, M. N., Dehal, P. S., and Arkin, A. P. (2010). FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 5, e9490.
- Reddy, B. L., and Saier, M. H. (2015). Autism and Our Intestinal Microbiota. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 25, 51–55.
- Romano-Keeler, J., Weitkamp, J.-H., and Moore, D. J. (2012). Regulatory properties of the intestinal microbiome effecting the development and treatment of diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 19, 73–80.
- Sánchez-Valverde, F., Gil, F., Martínez, D., Fernández, B., Aznal, E., Oscoz, M., et al. (2009). The impact of caesarean delivery and type of feeding on cow's milk allergy in infants and subsequent development of allergic march in childhood. *Allergy* 64, 884–889.
- Vázquez-Baeza, Y., Pirrung, M., Gonzalez, A., and Knight, R. (2013). EMPERor: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience* 2, 16.
- Villar, J., Valladares, E., Wojdyla, D., Zavaleta, N., Carroli, G., Velazco, A., et al. (2006). Caesarean delivery rates and pregnancy outcomes: the 2005 WHO global survey on maternal and perinatal health in Latin America. *Lancet* 367, 1819–1829.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., and Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267.
- World Health Organization Human Reproduction Programme, 10 April 2015 (2015). WHO Statement on caesarean section rates. *Reprod. Health Matters* 23, 149–150.
- Yu, C. G., and Qin, H. (2013). Recent progress on the role of gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J. Dig. Dis.* 14, 513–517.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de los metadatos de la secuenciación MiSeq (*SampleSheet*).

#SampleID	BarcodeSequence	LinkerPrimerSequence	SampleType	Child/family	Intervals	Age/Years	Age/Days	BirthType	Gender	BMI_category	Other/Parasites	Nutrition	Description
E006	CTAGCAGTATGA	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	mother	6 Y17	17	6363 NA	F	NA	NA	present	NA	mother_E006	
E019	ACCCTATTGGCGG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	mother	19 Y18	18	6820 NA	F	NA	NA	cerro	NA	mother_E019	
E020	TCGTTTCTTAGC	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	mother	20 Y30	30	10971 NA	F	NA	NA	cerro	NA	mother_E020	
E030	GGGGAACTGMAAG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	mother	30 Y14	14	5139 NA	F	NA	NA	present	NA	mother_E030	
E032	TCMAAGAAITACG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	mother	32 Y25	25	9375 NA	F	NA	NA	present	NA	mother_E032	
E036	AATGTACCACAGA	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	mother	36 Y19	19	7266 NA	F	NA	NA	present	NA	mother_E036	
E047	GTGTATCGCCAC	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	mother	47 Y21	21	7744 NA	F	NA	NA	present	NA	mother_E047	
E054	CTGTGGCATTGA	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	mother	54 Y19	19	7096 NA	F	NA	NA	cerro	NA	mother_E054	
E070	GTGCGTTGGACA	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	mother	70 Y35	35	13055 NA	F	NA	NA	present	NA	mother_E070	
E074	CCTGMAATTAAAG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	mother	74 Y24	24	8953 NA	F	NA	NA	present	NA	mother_E074	
HE006x02M	TCTACCCAGGMAAG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	6 M02	0.2	61 C-section	F	NA	NA	1 cerro	Breast	child_HE006_00M	
HE006x06M	AATATCGGGATC	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	6 M06	0.5	202 C-section	F	NA	NA	3 cerro	Breast	child_HE006_03M	
HE006x09M	TAGTGCATTGCGG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	6 M09	0.7	238 C-section	F	NA	NA	3 cerro	Combined	child_HE006_06M	
HE006x12M	TCMATGACCAGCA	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	6 M12	1	355 C-section	F	NA	NA	2 cerro	Combined	child_HE006_09M	
HE006x15M	CTATCGMAAGAT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	6 M15	1.3	488 C-section	F	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE006_12M	
HE006x18M	ATCGAATTCGAGT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	6 M18	1.5	537 C-section	F	NA	NA	1 present	TotalWearing	child_HE006_15M	
HE006x22M ^a	GGTACTGTATGCA	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	6 M22	1.8	656 C-section	F	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE006_18M	
HE006x22M ^b	ATCGAATTCGAGT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	6 M22	1.8	691 C-section	F	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE006_24M	
HE019x08M	ATGTTTAGACCGG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	19 M06	0.5	52 Vaginal	M	NA	NA	1 cerro	Breast	child_HE019_03M	
HE019x09M	ACATGTACACGTG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	19 M09	0.7	288 Vaginal	M	NA	NA	1 cerro	Breast	child_HE019_06M	
HE019x12M	CTTTAGCCGCTGG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	19 M12	1	374 Vaginal	M	NA	NA	1 cerro	Combined	child_HE019_09M	
HE019x15M	CTGGTCTTACCG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	19 M15	1.3	479 Vaginal	M	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE019_12M	
HE019x18M	CAAGTGTGMAATC	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	19 M18	1.5	556 Vaginal	M	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE019_15M	
HE019x22M	GCAAGTGTGAGG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	19 M22	1.8	647 Vaginal	M	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE019_18M	
HE019x24M	CTGCGTCAACCA	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	19 M24	2	710 Vaginal	M	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE019_24M	
HE020x02M	GTTAATGGCAGT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	20 M02	0.2	58 C-section	F	NA	NA	1 cerro	Breast	child_HE020_00M	
HE020x06M	GTAITGGAGCTAT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	20 M06	0.5	174 C-section	F	NA	NA	1 cerro	Combined	child_HE020_03M	
HE020x09M	CCTTCTGTATAC	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	20 M09	0.7	260 C-section	F	NA	NA	1 cerro	Combined	child_HE020_06M	
HE020x12M	ACGCTGTGCGTT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	20 M12	1	351 C-section	F	NA	NA	1 cerro	Combined	child_HE020_09M	
HE020x15M	CTCGTTTTCAGTT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	20 M15	1.3	449 C-section	F	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE020_12M	
HE020x18M	GGGAACTATAC	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	20 M18	1.5	561 C-section	F	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE020_15M	
HE020x22M	CTCTCATATGCT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	20 M22	1.8	659 C-section	F	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE020_18M	
HE020x24M	CGAATATCGCGT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	20 M24	2	785 C-section	F	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE020_24M	
HE030x02M	TCCGTTTCGTTTA	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	30 M02	0.2	71 Vaginal	F	NA	NA	1 cerro	Breast	child_HE030_00M	
HE030x06M	ACCACCGTAAACC	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	30 M06	0.5	188 Vaginal	F	NA	NA	1 cerro	Breast	child_HE030_03M	
HE030x09M	CATTTTCGGACTT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	30 M09	0.7	265 Vaginal	F	NA	NA	1 cerro	Combined	child_HE030_06M	
HE030x12M	TTAAGCGCCTGA	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	30 M12	1	377 Vaginal	F	NA	NA	1 cerro	Combined	child_HE030_09M	
HE030x15M	TGCGGATTCAT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	30 M15	1.3	468 Vaginal	F	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE030_12M	
HE030x18M	CAAACTGCGTTG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	30 M18	1.5	552 Vaginal	F	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE030_15M	
HE030x22M	TTAGACTGGGAA	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	30 M22	1.8	608 Vaginal	F	NA	NA	1 present	TotalWearing	child_HE030_18M	
HE030x24M	GACCGATAGGGA	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	30 M24	2	755 Vaginal	F	NA	NA	1 cerro	TotalWearing	child_HE030_24M	
HE032x02M	AGTACTTAAGTG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	32 M02	0.2	45 C-section	M	NA	NA	3 cerro	Breast	child_HE032_00M	
HE032x09M ^a	GGAITGCAAGATG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	32 M09	0.7	222 C-section	M	NA	NA	2 cerro	Breast	child_HE032_03M	
HE032x09M ^b	CCACTTGAAGAGT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	32 M09	0.7	281 C-section	M	NA	NA	3 cerro	Breast	child_HE032_06M	
HE032x12M	GCACTTCATATTC	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	32 M12	1	367 C-section	M	NA	NA	2 cerro	Combined	child_HE032_09M	
HE032x15M	AGAATCCACACAC	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	32 M15	1.3	472 C-section	M	NA	NA	2 cerro	TotalWearing	child_HE032_12M	
HE032x18M	CTCAAGTCAAAAG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	32 M18	1.5	549 C-section	M	NA	NA	3 cerro	TotalWearing	child_HE032_15M	
HE032x22M	GTACTACTAGCCTG	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	32 M22	1.8	640 C-section	M	NA	NA	3 cerro	TotalWearing	child_HE032_18M	
HE032x24M	CACTGAATACGT	CCGGACTACHVGGGTTWTCCTAAAT	child	32 M24	2	731 C-section	M	NA	NA	3 cerro	TotalWearing	child_HE032_24M	

HE07x02M	CATGTTGMAACA	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	36 M02	0.2	52 C-section	M	2	cerro	Breast	child_HE036.00M
HE036x06M	ATGGGACCTTCA	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	36 M06	0.5	168 C-section	M	1	cerro	Breast	child_HE036.03M
HE036x09M	GCTATTCTCAT	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	36 M09	0.7	261 C-section	M	1	cerro	Breast	child_HE036.06M
HE036x12M	GTCCTGMAAGA	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	36 M12	1	352 C-section	M	1	cerro	Combined	child_HE036.09M
HE036x15M	GTTCTGCTTGT	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	36 M15	1.3	464 C-section	M	2	cerro	TotalWeaning	child_HE036.12M
HE036x18M	GTCMAAGACTCA	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	36 M18	1.5	527 C-section	M	2	cerro	TotalWeaning	child_HE036.15M
HE036x22M	TTGTTACGTTCC	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	36 M22	1.8	674 C-section	M	2	present	TotalWeaning	child_HE036.18M
HE036x24M	CAAGTTGAGAITA	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	36 M24	2	772 C-section	M	1	present	TotalWeaning	child_HE036.24M
HE047x06M	CGGCAGTATAC	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	47 M06	0.5	154 Vaginal	M	1	cerro	Combined	child_HE047.00M
HE047x09M.a	AGTGGTGGAGG	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	47 M09	0.7	221 Vaginal	M	2	cerro	Combined	child_HE047.03M
HE047x09M.b	ATTCOCAGMAAG	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	47 M09	0.7	285 Vaginal	M	2	cerro	Combined	child_HE047.06M
HE047x12M	AGACGTTGCTAC	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	47 M12	1	348 Vaginal	M	1	cerro	TotalWeaning	child_HE047.09M
HE047x15M	AGAAATAGCGCTT	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	47 M15	1.3	453 Vaginal	M	2	cerro	TotalWeaning	child_HE047.12M
HE047x18M	AAGCGTACATTG	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	47 M18	1.5	544 Vaginal	M	1	cerro	TotalWeaning	child_HE047.15M
HE047x22M.a	GTTATGACGGAT	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	47 M22	1.8	635 Vaginal	M	1	cerro	TotalWeaning	child_HE047.18M
HE047x22M.b	AGCCTCATGATG	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	47 M22	1.8	691 Vaginal	M	1	cerro	TotalWeaning	child_HE047.24M
HE054x02M	CCAAACTCGTCG	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	54 M02	0.2	15 Vaginal	M	0	cerro	Breast	child_HE054.00M
HE054x06M.a	ACGTGAGGMAACG	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	54 M06	0.5	137 Vaginal	M	1	cerro	Breast	child_HE054.03M
HE054x06M.b	TGAATCGAAGCT	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	54 M06	0.5	173 Vaginal	M	1	cerro	Breast	child_HE054.06M
HE054x09M	CTGCAGTAAAGTA	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	54 M09	0.7	270 Vaginal	M	1	cerro	Breast	child_HE054.09M
HE054x12M	TATAGGCTCCGG	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	54 M12	1	353 Vaginal	M	1	cerro	Combined	child_HE054.12M
HE054x15M	ATCGTGTGTTGG	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	54 M15	1.3	472 Vaginal	M	1	cerro	Combined	child_HE054.15M
HE054x18M	CTTCCGAGACAA	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	54 M18	1.5	563 Vaginal	M	2	cerro	TotalWeaning	child_HE054.18M
HE054x22M	GCACTATACGCA	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	54 M22	1.8	682 Vaginal	M	3	present	TotalWeaning	child_HE054.24M
HE070x02M	CCAATGATTAAGC	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	70 M02	0.2	106 Vaginal	F	0	cerro	Breast	child_HE070.00M
HE070x06M	TTAAMCCGGCGCC	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	70 M06	0.5	155 Vaginal	F	0	cerro	Combined	child_HE070.03M
HE070x09M	CTTGCATACC GG	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	70 M09	0.7	278 Vaginal	F	0	cerro	Combined	child_HE070.06M
HE070x12M	GTGCACGATTAAT	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	70 M12	1	371 Vaginal	F	1	cerro	TotalWeaning	child_HE070.09M
HE070x15M	GGTCTAGGCTCA	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	70 M15	1.3	482 Vaginal	F	1	present	TotalWeaning	child_HE070.12M
HE070x18M	TCAAGGACGATTC	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	70 M18	1.5	546 Vaginal	F	1	cerro	TotalWeaning	child_HE070.15M
HE070x22M	GMAAGGTGAGAA	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	70 M22	1.8	644 Vaginal	F	1	cerro	TotalWeaning	child_HE070.18M
HE074x02M	GAATATACTGG	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	74 M24	2	728 Vaginal	F	1	present	TotalWeaning	child_HE070.24M
HE074x06M	CAAGCTGCAAAAT	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	74 M02	0.2	78 C-section	F	1	cerro	Breast	child_HE074.00M
HE074x09M	TTGGCAAGTACCG	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	74 M06	0.5	178 C-section	F	1	cerro	Combined	child_HE074.03M
HE074x09M	GCTTCTCTCACT	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	74 M09	0.7	262 C-section	F	1	cerro	Combined	child_HE074.06M
HE074x12M	CGAGATAGTTTG	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	74 M12	1	374 C-section	F	1	cerro	Combined	child_HE074.09M
HE074x15M	CGCGTCAAACTA	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	74 M15	1.3	465 C-section	F	1	cerro	TotalWeaning	child_HE074.12M
HE074x18M	TTGACACACGAC	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	74 M18	1.5	563 C-section	F	1	cerro	TotalWeaning	child_HE074.15M
HE074x22M	ATAAAGTGGCCT	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	74 M22	1.8	682 C-section	F	1	cerro	TotalWeaning	child_HE074.18M
HE074x24M	TTGCCCTTTGAT	CCGGACTACHVGGGTWTCCTAAI	child	74 M24	2	731 C-section	F	1	cerro	TotalWeaning	child_HE074.24M

Anexo 2. Pipeline bioinformático. Se incluyen los procedimientos y las rutinas de código empleadas para el análisis los datos y la elaboración de los gráficos. Esta información se ha incluido en plataformas públicas con acceso libre a fin de facilitar la reproducibilidad de los resultados.

La información detallada se encuentra en la siguiente dirección:

<http://132.248.169.182/~tobias/xoxocotla>

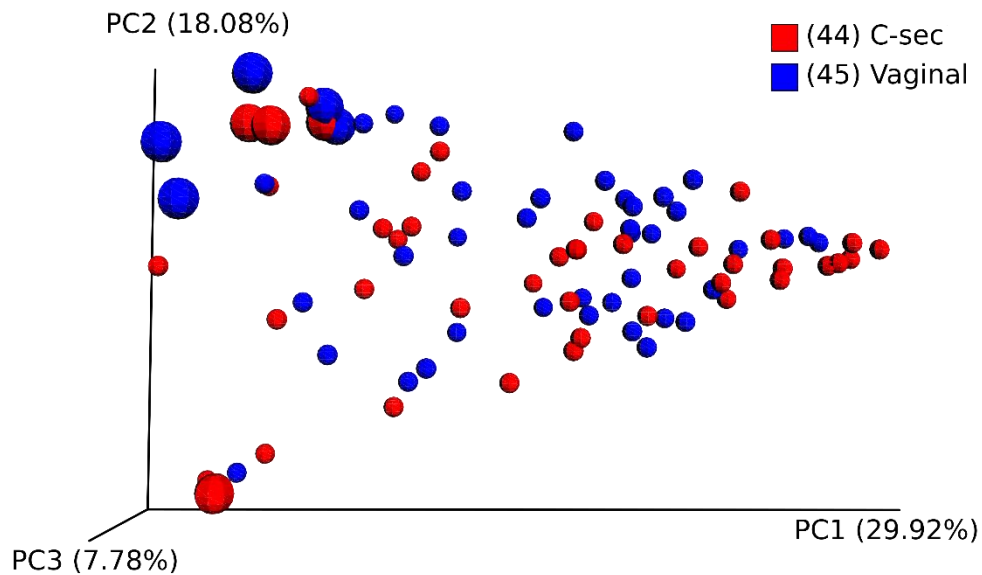


El proyecto también se encuentra disponible en la plataforma pública de *Open Science Framework*:

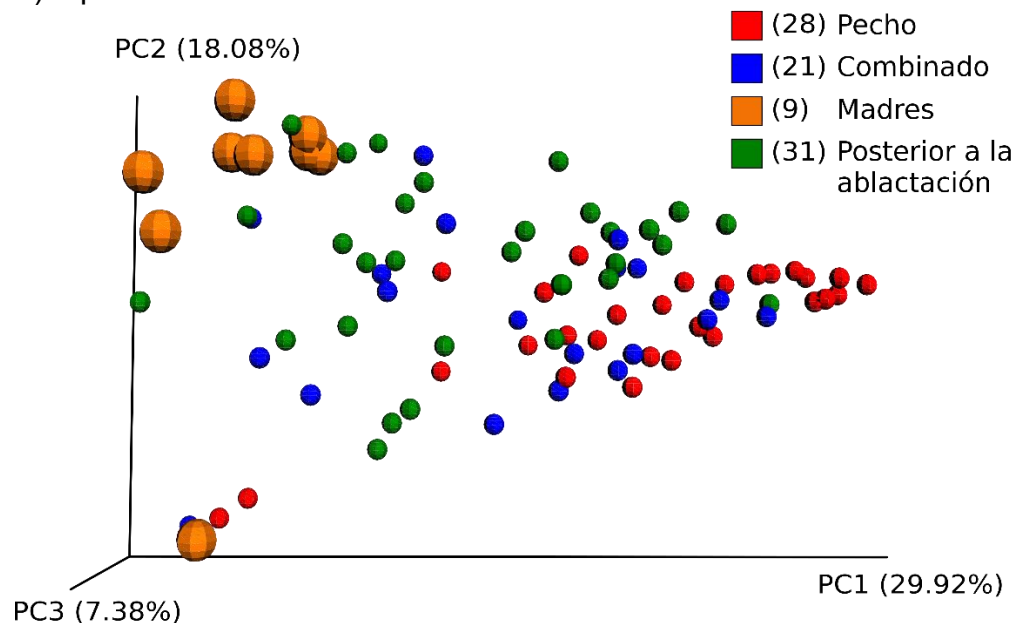
<https://osf.io/ar3se/>

Anexo 3. Coordenadas principales (PCoA) de la diversidad microbiana en donde se incluyen madres e infantes. Cada esfera representa la composición de la microbiota de una muestra diferente. Se ilustra con colores a) tipo de alumbramiento: cesárea (C-sec) versus parto (Vaginal), y b) tipo de alimentación. Las madres están representadas por las esferas de mayor tamaño. Porcentaje de variación explicada PC1 (31.23%), PC2 (14.11%), PC3 (8.75%)

a) Tipo de alumbramiento



b) Tipo de alimentación



Anexo 4. Coordenadas principales (PCoA) de la diversidad microbiana sólo de los infantes ilustrando el tipo de alumbramiento de cesárea (C-sec) versus parto (Vaginal) para cada una de las muestras de los infantes. En el gráfico se considera la variable tiempo (edad en años) en el eje de las abscisas. Porcentaje de variación explicada PC1 (29.89%) y PC2 (15.40%).

