



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

TESIS DE MAESTRÍA
RELACIÓN DEL ÍNDICE FIRMICUTES/BACTEROIDETES, SUS
MODULADORES AMBIENTALES Y EL PERCENTIL DEL PESO
PARA LA LONGITUD EN LACTANTES MENORES.

PRESENTA
LN. RAFAEL ANTONIO ALMENDRA PEGUEROS

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P. JUNIO 2019



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias en Investigación Clínica

Tesis de Maestría

Relación del índice Firmicutes/Bacteroidetes, sus moduladores ambientales y el percentil del peso para la longitud en lactantes menores.

Presenta

LN. Rafael Antonio Almendra Pegueros

Directora de tesis

Dra. en C. Úrsula Fabiola Medina Moreno

Asesores

D. en C. Antonio A. Gordillo Moscoso

M. en C. Tonatiuh Moreno Perlín

M. en C. Mauricio Pierdant Pérez

M. en C. América Mares García

M. en C. Claudia Butrón Tellez-Girón

Dr. C.A. Rogelio Flores Ramírez

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
 FACULTAD DE MEDICINA
 MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

TESIS DE MAESTRÍA

**RELACIÓN DEL ÍNDICE FIRMICUTES/BACTEROIDETES, SUS MODULADORES
 AMBIENTALES Y EL PERCENTIL DEL PESO PARA LA LONGITUD EN
 LACTANTES MENORES.**

PRESENTA

LN. RAFAEL ANTONIO ALMENDRA PEGUEROS

DIRECTORA DE TESIS	
Dra. en C. Úrsula Fabiola Medina Moreno	
ASESORES	
Dr. en C. Antonio Augusto Gordillo Moscoso	
M. en C. Mauricio Pierdant Pérez	
Dr. en C.A. Rogelio Flores Ramírez	
M. en C. América Susana Mares García	
M. en C. Claudia Butrón Tellez-Girón	
M. en C. Tonatiuh Moreno Perlín	
SINODALES	
M. en C. Amado Nieto Caraveo	
Dra. en C. Othir Gidalti Galicia Cruz	
Dr. Gilberto Fabián Hurtado Torres	
LNCA. Evelia Apolinar Jiménez, ENCP	
M. en C. Ma. del Pilar Fonseca Leal Jefe de Investigación y Posgrado Clínico Facultad de Medicina UASLP	Dr. en C. Antonio Gordillo Moscoso Coordinador de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica

RESUMEN

Antecedentes. El incremento en la prevalencia de sobrepeso/obesidad, así como el aumento de enfermedades crónicas en la población, nos ha llevado a tratar de identificar posibles vías fisiopatológicas de esta problemática, como lo es el perfil de la microbiota intestinal. Perfil que puede ser estudiado a partir del índice Firmicutes/Bacteroidetes. **Objetivo.** Relacionar el índice Firmicutes/Bacteroidetes, sus moduladores ambientales con la puntuación percentilar del peso para la longitud en lactantes menores. **Metodología.** Se diseñó un estudio transversal, con la participación de 30 lactantes menores de hasta seis meses de edad, nacidos a término, sin diagnóstico de enfermedad metabólica o autoinmune, sin infección activa y cuyos padres firmaron el consentimiento informado. Por entrevista directa se obtuvieron los datos de los moduladores de la microbiota intestinal y a partir de una muestra fecal se extrajo DNA bacteriano y por qPCR se cuantificaron los niveles de Firmicutes y Bacteroidetes para la realización del índice. En el programa estadístico R y RStudio version 1.153 se realizaron el análisis descriptivo de las variables, correlación de Spearman, regresión lineal múltiple y análisis de la varianza (ANOVA). **Resultados.** El 50% de la muestra fue del sexo femenino, 13.3% con sobrepeso/obesidad, 23.3% con lactancia materna exclusiva, 33.3% tomaron antibióticos y 26.7% toma de suplementación (pre-pro-simbióticos). Los principales moduladores del índice Firmicutes/Bacteroidetes fueron tipo de nacimiento, edad y suplementación, con los cuales se ajustó el índice mostrando una posible relación con la puntuación percentilar del peso/longitud (Rho 0.118, IC -0.25 a 0.45, p=0.531). Al realizar las comparaciones del estado de nutrición entre grupos, se observó un posible incremento de dicho índice en los grupos desnutrición y sobrepeso/obesidad en comparación con el estado normal ($p>0.084$). **Conclusiones.** Los niveles del índice Firmicutes/Bacteroidetes podrían estar relacionados con ambos estados de la malnutrición (Desnutrición y Sobre peso/Obesidad) en lactantes menores, así como sus moduladores (tipo de nacimiento, edad y suplementación). Es necesario se confirmen los resultados aquí reportados, incrementando el tamaño muestral.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	9
LISTA DE DEFINICIONES	10
AGRADECIMIENTOS	11
ANTECEDENTES	
MICROBIOTA INTESTINAL	14
COLONIZACIÓN MICROBIANA INTESTINAL.	15
MODULADORES AMBIENTALES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	
FORMA DE NACIMIENTO.	16
ALIMENTACIÓN INFANTIL.	17
CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS	18
OTROS MODULADORES	18
MICROBIOTA INTESTINAL EN LA SALUD Y ENFERMEDAD	
MICROBIOTA INTESTINAL Y OBESIDAD	20
SOBREPESO Y OBESIDAD	21
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
JUSTIFICACIÓN	22
OBJETIVOS	23
HIPÓTESIS	23
METODOLOGÍA	
DISEÑO DEL ESTUDIO	24
LUGAR DE REALIZACIÓN	24
UNIVERSO Y UNIDADES DE OBERBACIÓN	24
CRITERIOS DE SELECCIÓN	24
VARIABLES EN EL ESTUDIO	25
CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA	25
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
CONCORDANCIA EN LAS MEDICIONES	27
ASPECTOS ÉTICOS	27
PLAN DE TRABAJO	28
CAPITAL HUMANO Y RECURSOS MATERIALES	29
RESULTADOS	
CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE LA POBLACIÓN	30
RELACIÓN DEL ÍNDICE FIRMICUTÉS/BACTEROIDETES Y LA PUNTUACIÓN PERCENTILAR DEL PESO/LONGITUD.	31
ÍNDICE FIRMICUTÉS/BACTEROIDETES Y SUS MODULADORES AMBIENTALES.	32
RELACIÓN ÍNDICE FIRMICUTÉS/BACTEROIDETES AJUSTADO Y LA PUNTUACIÓN PERCENTILAR DE PESO/LONGITUD.	34
RELACIÓN DEL ÍNDICE FIRMICUTÉS/BACTEROIDETES AJUSTADO Y EL PORCENTAJE DEL PESO/LONGITUD.	35

COMPARACIÓN DEL ÍNDICE FIRMICUTES/BACTEROIDETES DE ACUERDO CON EL ESTADO DE NUTRICIÓN CON LOS PUNTOS DE CORTE PARA P/L PROPUESTO POR LA OMS.	36
DISCUSIONES	38
LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	41
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	43
ANEXO 1. FUNCIONES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	49
ANEXO 2. CARTAS DE ACEPTACIÓN DE LOS COMITÉS DE ÉTICA	50
ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO	53
ANEXO 4. AVISO DE PRIVACIDAD.	56
ANEXO 5. FOLLETO DE INVITACIÓN.	57
ANEXO 6. FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.	59
ANEXO 7. EVALUACIÓN DEL ESTADO DE NUTRICIÓN EN EL LACTANTE MENOR.	63
ANEXO 8. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA DE MUESTRA FECAL.	69
ANEXO 9. PROTOCOLO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), PARA AMPLIFICACIÓN DE DNA BACTERIANO (16S)	70
ANEXO 10. CONDICIONES DE qPCR PARA CUANTIFICACIÓN DE UNIDADES DE ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS FILOS FIRMICUTES Y BACTEROIDETES	71

LISTA DE TABLAS

	Págs
Tabla 1. Cuadro de variables en el estudio.	25
Tabla 2. Descripción de las variables antropométricas y los moduladores ambientales de la microbiota intestinal en la población estudiada.	30
Tabla 3. Modelo de regresión lineal que explica la variabilidad en el índice Firmicutes/Bacteroidetes en escala logarítmica.	32
Tabla 4. Modelo de regresión lineal para ajuste de a variabilidad en el índice Firmicutes/Bacteroidetes en escala logarítmica.	33
Tabla 5. Índice Firmicutes/Bacteroidetes de acuerdo con las clasificaciones del estado de nutrición.	36

LISTA DE FÍGURAS

	Págs
Figura 1. Papel de los moduladores de la microbiota intestinal y el efecto de la disbiosis	19
Figura 2. Relación del percentil P/L y el índice Firmicutes/Bacteroidetes	31
Figura 3. Relación del percentil P/L y el índice Firmicutes/Bacteroidetes ajustado	34
Figura 4. Relación del porcentaje P/L (Índice de Waterlow) y el índice Firmicutes/Bacteroidetes ajustado	34
Figura 5. Análisis de la Índice Firmicutes/Bacteroidetes de acuerdo con el estado de nutrición	37

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ANOVA. Análisis de la Varianza

CONACYT. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

ΔCt. Ct primer específico – Ct primer universal.

Ct. Ciclo de amplificación de la qPCR en el que alcanzaba el umbral establecido.

DNA. Ácido Desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés.

DM2. Diabetes Mellitus tipo 2.

DLM. Días de lactancia materna exclusiva.

ENSANUT 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012.

ENSANUT-MC 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición-Medio Camino 2016.

ETA². Medida del tamaño del efecto para el análisis de la varianza.

F/B. Índice Firmicutes/Bacteroidetes.

ICT. Índice Cintura/Talla

IMC. Índice de Masa Corporal

IMC/E. Índice de Masa Corporal para la Edad.

ISSSTE. Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

OMS. Organización Mundial de la Salud.

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés.

P/L. Índice Peso/Longitud o Peso/Talla.

PPL. Percentil del índice Peso/Longitud.

qPCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa, por sus siglas en inglés.

TN. Tipo de Nacimiento.

TA. Días de Toma de Antibiótico.

UAR. Unidad de Abundancia Relativa

LISTA DE DEFINICIONES.

BACTEROIDETES. Grupo grande de bacterias Gram negativas y anaerobias, con amplia distribución en el medio ambiente, incluyendo el suelo, sedimentos, agua de mar y el tracto gastrointestinal de animales y humanos.

DISBIOSIS INTESTINAL. Alteraciones de la microbiota intestinal y la respuesta adversa del huésped a estos cambios.

FIRMICUTES. Del latín *firmus*=fuerte y *cutis*=piel, en referencia a su gruesa pared celular. Es un filo de bacterias, la mayoría de las cuales tienen una estructura celular Gram positiva. La mayoría de las bacterias que se encuentran en la microbiota intestinal integran este filo.

ÍNDICE FIRMICUTES/BACTEROIDETES. Indica la funcionalidad, maduración y composición de la microbiota intestinal; cambios en este índice puede reflejar disbiosis y asociación a ciertas patologías.

MICROBIOTA INTESTINAL. Población microbiana que reside en una locación determinada (tracto gastrointestinal), bacterias y otros microorganismos como hongos, arqueas, virus y protozoos.

LACTANTE MENOR. Niño entre 1 y 12 meses de vida postnatal. Para este protocolo se considerará como lactante menor hasta los 6 meses de vida postnatal.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR, por sus siglas en inglés). Técnica de biología molecular que permite amplificar un gran número de copias de un fragmento de DNA específico, siendo útil para identificar con una muy alta probabilidad, virus y bacterias.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR, por sus siglas en inglés). Es una variante de la técnica de PCR, que permite ampliar y cuantificar de forma absoluta el producto de amplificación de DNA.

AGRADECIMIENTOS

“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado”.

Albert Szent-Györgyi

Llámese destino, madre naturaleza, Dios, karma, cualquier ser superior o nuestras propias decisiones que nos han llevado a tener esto que llamamos vida, **Gracias**, porque a partir de ello han aparecido personas necesarias en su momento, como innecesarias al pasar el tiempo, experiencias buenas y malas, pero todas llenas de aprendizajes.

Gracias a mis padres: **Margarita y José Antonio**, por sembrar la semilla de la formación constante, por impulsar cada pequeño o grande sueño que he tenido, por estar a la distancia, desde unos 252 Km, hasta a más de 8,820 Km y a pesar de ello sostener siempre mi espalda. A mis queridos hermanos **Luis y Daniel**, con los cuales he compartido momentos importantes de mi vida, así como estos dos años de con sus altos y bajos, con quienes he podido hablar a la distancia, discutir a la distancia, pero sobretodo saber que a menos de un mensaje estará.

A mis pequeños monstruos: **Dasha y Danielito**, con quienes he perdido momentos emocionantes de sus vidas, pero que sin duda algún vídeo o foto me ha quedado de recuerdo.

Gracias a todo ese conjunto de personas que conocemos como familia, que sería una lista interminable, pero no por ello son menos importantes.

A mis queridas maestras **Gloria Luz Noriega, Tere Rosas, Silvia Valera y Caro Palmeros**, quienes abonaron mucho en la formación ofrecida, durante mi formación de pregrado, buscando generar una visión más allá de lo conocido o mínimo deseable, por fomentar poco a poco el interés en la investigación y por hoy encontrarme aquí.

Al gran grupo de investigación que se ha formado en el pequeño espacio de nuestro **Laboratorio de Investigación Traslacional en Farmacología**, mis queridos y admirados **Dr. Antonio, Urs y Edgar**; quienes fueron motor fundamental en la realización de esta tesis, ya que en muchas veces convirtieron sus vehículos en el “Pañal-Móvil” a través de los interminables muestreos por toda la ciudad, así como

horas y horas en el *Lab* procesando muestra, obteniendo resultados. Pero sobretodo por ser unos excelentes amigos y compañeros de trabajo, por otorgar comentarios muy acertados en cada fase de esta tesis, por ser unos excelentes compañeros de trabajo, excelentes amigos, mentores, vaya una familia. Pocas son estas líneas para agradecer el haber coincidido en este espacio-tiempo.

Para realizar esta tesis, fue imprescindible la participación de mi comité de asesores, el **Dr. Mau, Dr. Rogelio, Claudia, Tona y Mery**, por sus valiosos comentarios que enriquecieron el desarrollo de este trabajo. Muchas gracias. También es oportuno incluir en estos agradecimientos a todos los que conforman el **Departamento de Epidemiología Clínica**, por ser un apoyo constante en estos dos años, así como a mis compañeros de generación y otras generaciones, que aportaron comentarios importantes en mis seminarios.

Y debo agradecer no solo al Dpto. de Epidemiología Clínica, sino también al extraordinario **Centro de Información en Ciencias Biomédicas**, que tenemos en la UASLP, gracias por el apoyo en la recuperación de información, por ser fuente de buenas ideas y de muy buenos amigos, gracias a **Lupita, Silvia y Chivis**, por sus porras en el último estirón de este trabajo.

A mis grandes amigos que SLP y la Maestría ha dejado para mi: **María Presa, Rox López y Jerry**. Gracias por hacer de estos dos años, momentos muy llevaderos, por ser un apoyo fundamental en el día a día, por los viajes, por las risas, por mucha comida y mucho vino. Gracias pequeña familia Mexa-Española, Os quiero.

A mi querida *roomie* culichi (sí hasta miedo da escribir esta línea), gracias por apoyarme en mis momentos de estrés, en los que la vida parecía que se había encariñado jodiéndome duro, en los que parecía que este momento no llegaría, gracias por viajar hasta Irapuato por poco menos que medio mililitro, gracias por todo mi querida **Ale** y también a **Rossy**, que me salvaste de una muy grande.

Al **Laboratorio de Fisiopatología Vascular** del Hospital Nacional de Parapléjicos, Toledo, España, (Maru, Tati, Lau, Tamara, Nerea y Germán) por aportar una gran cantidad de conocimientos en técnicas básicas de proteómica que podrán ser empleadas a lo largo de mi actividad científica y sobretodo por dejarme aportar

conocimientos desarrollados en esta maestría, gracias por los tres meses de una maravillosa estancia, que dieron inicio a un buen equipo de trabajo y gran amistad.

Y sí, también a mis queridos alumnos de pregrado, que durante dos años vivieron estresados cuando tenía seminario, que se interesaban en mi investigación, preguntaban y sobretodo colaboraron en mi muestreo, muchas gracias.

Por último, agradecer a todos a quienes me encontré a lo largo de estos dos años, con quienes platicué en pasillos o reuniones, un poco de mi tesis, mostrando interés o algunas recomendaciones. Y gracias a ti que has iniciado por leer esta tesis, esperando que pueda aportar algo en tu desarrollo académico.

“La educación científica de los jóvenes es al menos tan importante, quizá incluso más, que la propia investigación”.

Glenn Theodore Seaborg

Rafael Antonio Almendra-Pegueros

I. ANTECEDENTES

1. MICROBIOTA INTESTINAL.

La microbiota intestinal humana es un ecosistema complejo, su genoma (microbioma) representa aproximadamente más de 100 veces el genoma humano^(1,2). De acuerdo a lo reportado por Frank y cols., se estima que el ecosistema intestinal está compuesto por más de 35,000 especies bacterianas, la mayoría de ellas asociadas a los siguientes filos: Firmicutes (49% de copias), Bacteroidetes (23%), Proteobacteria (21%) y Actinobacteria (5%)⁽³⁾.

La microbiota intestinal mantiene un equilibrio dinámico que varía entre los grupos humanos e incluso de persona a persona, y presenta un rol importante en los procesos de salud-enfermedad. Sin embargo, cuando este equilibrio llega a modificarse, por aumento o disminución de ciertas poblaciones (disbiosis intestinal), pueden causar infecciones o enfermedades nosocomiales⁽⁴⁾.

A partir de los datos reportados por Frank y cols., en 2007, se determinó que el índice Firmicutes/Bacteroidetes, refleja la composición y diversidad del ecosistema intestinal⁽⁵⁾. Estudios previos han encontrado que cambios en este índice están relacionados con enfermedades cardiovasculares, inmunológicas e inflamatorias.

En la medición del índice Firmicutes/Bacteroidetes, una de las estrategias con mayor uso es la PCR en tiempo real (qPCR), que permite su cuantificación en Unidades de Abundancia Relativa (UAR) de cada uno de los filos, a partir de la siguiente fórmula: $UAR=2^{-\Delta Ct}$, donde UAR=Unidades de Abundancia Relativa, $\Delta Ct=Ct$ primer específico - Ct primer universal. Las UAR son proporcionales a la cantidad de DNA que se amplifica en cada ciclo de la qPCR. ^(6,7)

Por ejemplo:

$$UAR \text{ Firmicutes} = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(21.49-20.37)} = 2^{-1.12} = 0.46$$

$$UAR \text{ Bacteroidetes} = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(22.36-20.37)} = 2^{-1.99} = 0.25$$

$$\text{Índice Firmicutes/Bacteroidetes} = 0.46/0.25 = 1.84$$

A pesar de la poca información disponible acerca de la diversidad y funcionalidad de las bacterias que integran la microbiota intestinal, se sabe que algunas de ellas participan en funciones importantes de la fisiología del hospedador como metabolismo de nutrientes, inmunomodulación, función antimicrobiana, barrera intestinal y estructura del tracto gastrointestinal (Anexo 1).

2. COLONIZACIÓN MICROBIANA INTESTINAL.

Por las interacciones presentes con la fisiología del huésped, la colonización de la microbiota intestinal es un proceso esencial en nuestro ciclo de vida. Anteriormente se creía que el proceso de colonización iniciaba hasta el momento del parto, ahora se reconoce la presencia de bacterias en la placenta, sangre del cordón umbilical, líquido amniótico y membranas fetales de recién nacidos sanos sin ninguna sospecha de infección o inflamación⁽⁸⁾.

La microbiota prenatal es influenciada por las características fisiológicas y patológicas de la madre. En mujeres con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) pregestacional, la microbiota del meconio es caracterizada por un menor número de Bacteroidetes en comparación con el grupo de gestantes sin DM2 o diabetes gestacional, situación similar a la microbiota intestinal de adultos con diabetes mellitus tipo 2⁽⁹⁾.

A pesar de la existencia de microbiota prenatal, la microbiota intestinal del neonato no comparte características con ella; sin embargo, se ha demostrado que la microbiota prenatal puede estar asociada a respuesta inflamatorias en el recién nacido, supresión de ellas y problemas respiratorios posnatales⁽¹⁰⁾.

Los primeros microorganismos colonizadores identificados son: *E. coli* y *enterococcus* (*E. faecalis* y *E. faecium*), anaerobios facultativos que promueven la creación de un nuevo ecosistema para la colonización por anaerobios estrictos como *Bacteroides*, *Clostridium*, y *Bifidobacterium spp*; grupos bacterianos que tienen rol importante en la maduración de la microbiota neonatal^(11,12). La microbiota intestinal del neonato es caracterizada por una reducida diversidad y un dominio relativo por los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteria*⁽¹³⁾.

Con el paso de la vida posnatal, la microbiota comienza a poseer mayor diversidad y los filos firmicutes y bacteroidetes dominan la composición microbiana.

Después del primer año de vida, el perfil microbiano de la microbiota intestinal presenta variaciones entre individuos, y se encamina a una microbiota característica de un individuo adulto (en términos de diversidad y composición), la cual se estabiliza entre los 2 y 5 años.

Debido a esto, los primeros tres años de vida de un niño son considerados como un periodo crítico para realizar intervenciones nutricias que mejoren su crecimiento y desarrollo; dado que la microbiota intestinal juega un rol en estos procesos, cualquier alteración que pueda presentarse en el ecosistema intestinal podría traducirse en afecciones en la salud del huésped⁽¹⁰⁾.

3. MODULADORES AMBIENTALES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.

La microbiota intestinal constituye un equilibrio dinámico que varía entre los grupos humanos debido a diferencias específicas del hospedador como: forma de nacimiento, edad, estado de salud, dieta, estrés o la administración de antibióticos u otros medicamentos⁽¹⁴⁾.

3.1.FORMA DE NACIMIENTO.

Se ha reportado que los niños nacidos por cesárea tienen una microbiota caracterizada por *Enterobacter hormaechei*/E. *cancerogenus*, *Haemophilus parainfluenzae*/ H. *aegyptius*/H. *influenzae*/H. *haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*/S. *lugdunensis*/S. *aureus*, *Streptococcus australis* y *Veillonella dispar*/V. *parvula*, indicando que la primera fuente de colonización ha sido la piel materna, además de microorganismos presentes en el ambiente donde se realizó dicho procedimiento. Mientras que, aquellos que nacieron por parto vaginal presentaron un ecosistema en el que destacan bacterias del género *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides*, *Escherichia/Shigella*, propias de la cavidad vaginal⁽¹⁵⁾.

La modificación de la microbiota intestinal por el tipo de nacimiento, en especial el nacimiento por cesárea, se ha asociado a un mayor riesgo de obesidad, asma y

alergias; esto atribuible a la alteración en el proceso de colonización normal: aumento de *Staphylococcus* y disminución de *Bifidobacterium*^(16,17)

3.2. ALIMENTACIÓN INFANTIL.

La alimentación durante los primeros días de vida posnatal es la vía continua de colonización bacteriana; se ha identificado la relación de ciertos patrones dietéticos con cambios en la microbiota intestinal.

Además, existen reportes sobre las diferencias entre la microbiota intestinal de niños alimentados al seno materno y la de aquellos alimentados con fórmulas lácteas. Mientras que los primeros poseen una microbiota dominada por el filo *Bifidobacterium*; los alimentados exclusivamente con fórmulas lácteas presentan una microbiota más diversa con incremento en la abundancia de *Escherichia Coli*, *Clostridia*, *Bacteroides* y *Lactobacillus*^(10,18).

Lo anterior puede explicarse por la presencia de los oligosacáridos de la leche humana y otros compuestos inmunológicos como: IgA, lactoferrina y lisozima, que pueden interactuar para modificar la microbiota intestinal^(19,20).

De igual forma se ha documentado que la leche humana es fuente de una carga bacteriana que va de 10^2 a 10^4 copias de genes bacterianos por mililitro, participando continuamente en la colonización de la microbiota intestinal. La microbiota de la leche materna se modifica a lo largo del tiempo: en los primeros meses está constituida principalmente por *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacilos* y después de los seis meses es comparada con la microbiota oral y se incluyen *Veillonella* y *Prevotella*^(21,22).

La introducción de alimentos sólidos y la disminución en la cantidad de leche materna consumida es un factor importante para cambios notorios en la maduración y diversidad de la microbiota intestinal, aumentando la población de *Bacteroides*, *Clostridium* y la disminución de *Lactobacilos* y *Bifidobacterium*^(15,23).

3.3. CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS

Se ha reportado el efecto del consumo de antibióticos en el microbiota intestinal, el cual es dependiente del tipo de antibióticos y de las diferencias características de los individuos (sexo, edad y dieta).

En recién nacidos expuestos a antibióticos, los géneros anaerobios estrictos como *Bacteroides spp.* y *Bifidobacterium spp.* se encuentran depletados, mientras que los niveles de *Proteobacterias* están aumentados.^(18,24,25)

De igual forma, el consumo de antibióticos durante la gestación y lactancia afecta la composición de la microbiota intestinal, disminuyendo los niveles de *Bacteroides spp.*, y *Atopbiium spp.*⁽²⁶⁾, probablemente como consecuencia de los cambios que sufre la microbiota vaginal⁽²⁷⁾.

A partir de las modificaciones en la microbiota intestinal, ejercida por el consumo de antibióticos, es que se ha descrito que el consumo de antibióticos en etapas tempranas de la vida se ha asociado con el incremento en la ganancia de peso y posterior desarrollo de sobrepeso y obesidad infantil⁽²⁸⁻³⁰⁾.

3.4. OTROS MODULADORES

Las condiciones del hogar en donde el recién nacido se desarrolla, son moduladores importantes de la microbiota intestinal. Infantes con hermanos mayores presentan una microbiota más diversa en comparación con aquellos que son los hijos mayores; situación que puede deberse a transferencia bacteriana entre hermanos, o a diferencias entre la composición de la leche materna y/o de la microbiota vaginal entre madres primerizas y aquellas con hijos previos^(31,32).

La ubicación geográfica también marca diferencias en la microbiota de la población; la microbiota de niños nacidos en países en desarrollo está caracterizada por un aumento en los niveles de *Prevotella*, y decremento en la abundancia de *Bacteroides*, en comparación con infantes nacidos en países desarrollados⁽³³⁻³⁵⁾. Es posible que el efecto de la ubicación geográfica sea el reflejo de los patrones alimentarios propios de cada región⁽²³⁾.

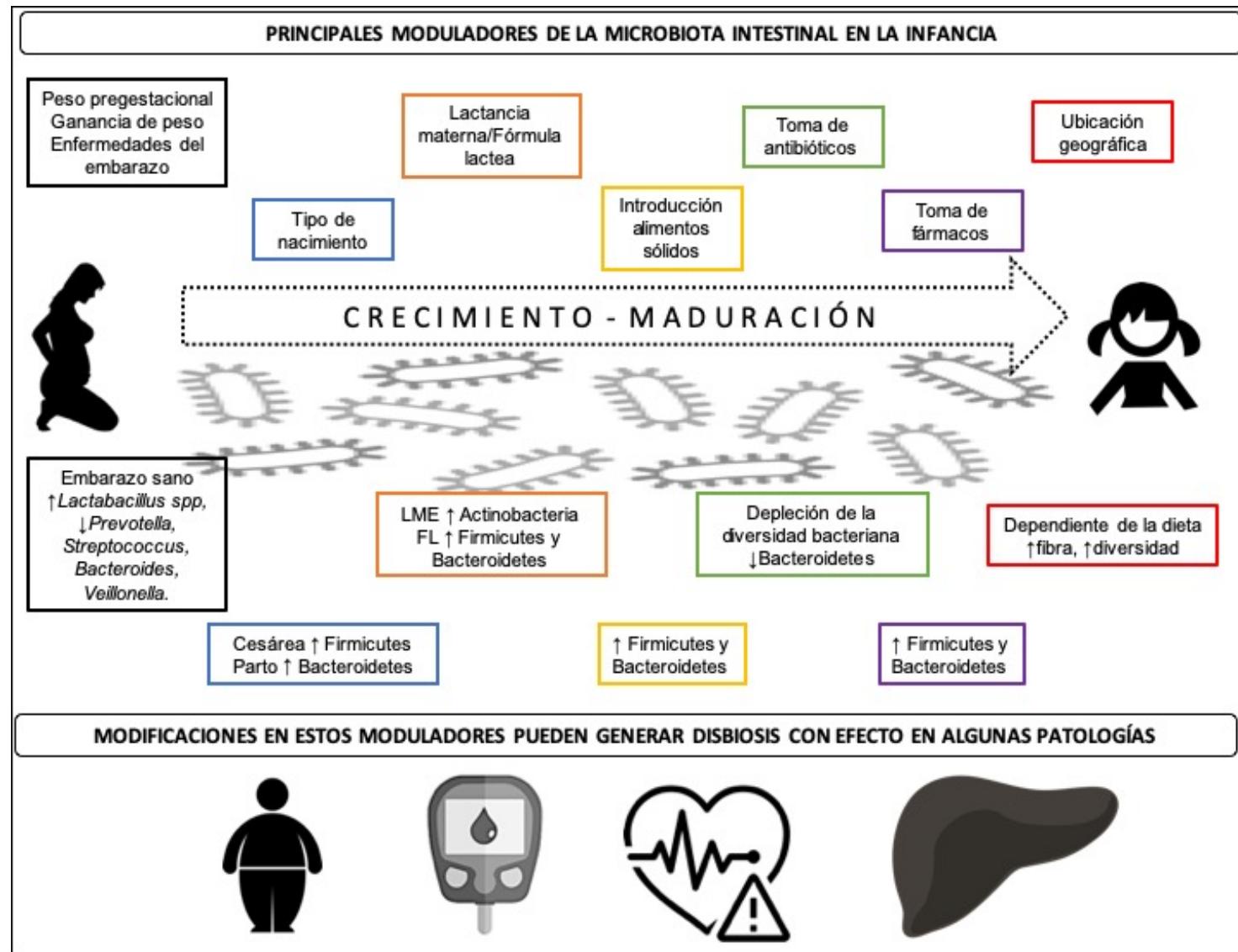


Figura 1. Papel de los moduladores de la microbiota intestinal y el efecto de la disbiosis. Adaptado de Jandhyala SM y cols (36).

4. MICROBIOTA INTESTINAL EN LA SALUD Y ENFERMEDAD

La pérdida del equilibrio en la relación entre bacterias protectoras y patógenas en el ecosistema intestinal es conocido como *disbiosis*, aberraciones en la composición normal de la microbiota intestinal⁽³⁷⁾. Esta disbiosis puede ser derivada de los factores moduladores de la microbiota intestinal previamente comentados⁽³⁸⁾.

4.1. MICROBIOTA INTESTINAL Y OBESIDAD

Existe evidencia de que algunos microorganismos encontrados en el ecosistema intestinal participan en la captación de la energía de la dieta, así como en el aumento o disminución de la grasa corporal^(16,39).

Kalliomaki y cols., identificaron que la colonización temprana de niños con obesidad a los 7 años de edad, se caracterizaba por menor número de *Bifidobacterium* y mayores de *Staphylococcus*, este hecho se encuentra relacionado con el aumento adecuado de peso materno y la práctica de la lactancia materna como factores protectores contra el desarrollo de obesidad infantil^(23,40-42).

Previamente, en escolares mexicanos de 6-14 años, se evaluó la asociación entre el perfil de la microbiota intestinal y la obesidad, así como el posible efecto del patrón alimentario; se observó un incremento en el riesgo de obesidad asociado a un mayor índice de firmicutes/bacteroidetes, en combinación con una mayor ingesta de energía, hidratos de carbono simples y grasas saturadas⁽⁴³⁾.

Otros estudios han integrado al análisis de la microbiota intestinal y la obesidad, la exposición a factores moduladores de ella, como es el caso de los antibióticos. Dentro de las conclusiones de estos estudios, destacó que la exposición a este factor durante los primeros 6 meses de vida se asocia a mayor peso corporal a los 10 y 38 meses de edad^(29,30,44).

5. SOBREPESO Y OBESIDAD

La presencia de obesidad en la edad pediátrica es uno de los problemas de salud pública más importantes en el mundo, ya que es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, hipertensión, dislipidemias y alteraciones en el metabolismo de la glucosa.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2016 más de 41 millones de niños menores de 5 años presentaban sobrepeso u obesidad(45). En México, con los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición a Medio Camino 2016, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en este grupo etario era de 6.15%(46).

Para menores de 2 años, la prevalencia nacional no se conoce; en 2014, Álvarez-Villaseñor y George-Flores, reportaron una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad de 17.3% en niños de guarderías de Baja California Sur(47).

Para la identificación del sobrepeso y obesidad en la etapa pediátrica se han propuesto el uso de ciertos índices, como el peso para la longitud (P/L), ya sea en puntuación percentilar o en desviación estándar.

Conforme a la propuesta de la OMS en el 2007, se identifica a un sujeto con sobrepeso u obesidad cuando la puntuación percentilar del P/L es igual o mayor a 85⁽⁴⁸⁾.

II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe relación entre el índice Firmicutes/Bacteroidetes, sus moduladores ambientales y la puntuación percentilar del peso/longitud en lactantes menores?

III. JUSTIFICACIÓN

El aumento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad alrededor del mundo, especialmente en población pediátrica, condiciona la aparición de comorbilidades asociadas a estas en edades más tempranas. Esta situación ha derivado en un creciente interés en el estudio de dicho problema.

A partir de lo anterior, se ha documentado que la alteración del proceso de estabilización y de la composición de la microbiota intestinal, se relacionan con el aumento del peso corporal, el acúmulo y distribución del tejido graso y posterior desarrollo de sobrepeso y obesidad.

Existe un reporte en población mexicana donde se estudió la relación de sobrepeso/obesidad con alteraciones en la microbiota intestinal, sin embargo, fue realizado en escolares de 8 a 14 años, y consideramos que la edad estaría fuera del rango de prevención de complicaciones asociadas al aumento de peso, siendo importante esclarecer la relación de la microbiota intestinal con el sobrepeso/obesidad desde edades más tempranas.

Al identificar determinadas características de la composición de la microbiota intestinal, a partir del índice firmicutes/bacteroidetes y los moduladores ambientales que afecten la relación de esta con sobrepeso/obesidad en lactantes, se podrían diseñar a futuro estrategias de modificación del ecosistema intestinal en materia de prevención.

IV. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Relacionar el índice Firmicutes/Bacteroidetes, sus moduladores ambientales con la puntuación percentilar del peso para la longitud en lactantes menores.

5.2. Objetivos específicos

- Calcular el percentil del peso para la longitud en lactantes menores.
- Cuantificar el número de copias por PCR en tiempo real (qPCR) de firmicutes y bacteroidetes.
- Obtener el índice firmicutes/bacteroidetes.
- Identificar el patrón de moduladores ambientales:
 - Tipo de nacimiento
 - Lactancia materna exclusiva en los últimos seis meses
 - Tratamiento antibiótico en los últimos seis meses
- Relacionar el percentil del peso para la longitud con el índice firmicutes/bacteroidetes
- Relacionar el índice Firmicutes/Bacteroidetes con sus moduladores ambientales.

V. HIPÓTESIS

El índice Firmicutes/Bacteroidetes estará positivamente relacionado con sus moduladores ambientales y la puntuación percentilar Peso/Longitud, en lactantes menores.

VI. METODOLOGÍA

6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Transversal analítico.

6.2. LUGAR DE REALIZACIÓN

- Laboratorio de Investigación Traslacional en Farmacología, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Guarderías, estancias infantiles y población abierta de la ciudad de San Luis Potosí.

6.3. UNIVERSO, UNIDADES DE OBSERVACIÓN, MÉTODO DE MUESTREO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Lactantes menores de la ciudad de San Luis Potosí.

6.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión

- Lactantes menores (de 40 días a 6 meses de edad)
- Cualquier sexo
- Lactantes que residan en San Luis Potosí, S.L.P.
- Firma del consentimiento informado por los padres o tutores

Criterios de no inclusión

- Diagnóstico previo de enfermedades metabólicas o inmunológicas.
- Lactantes con infección activa
- Lactantes no nacidos a término.

Criterios de eliminación

- Solicitud de salida por parte de los padres o tutores.
- Pérdida de la muestra

6.5. VARIABLES EN EL ESTUDIO

Variable	Descripción operacional	Unidades	Valores posibles	Tipo de escala
PPL	Puntuación percentilar del Peso/Longitud	Unidades arbitrarias	0-100	Continua
F/B	Índice firmicutes/bacteroidetes	Unidades de Abundancia Relativa (UAR)	0-∞	Continua
DLM	Días de LM exclusiva	Días	0-180	Continua
TN	Tipo de nacimiento	1 y 2	1: Parto vaginal 2: Cesárea	Dicotómica
TA	Días de toma de antibiótico en los meses previos	Días	0-180	Continua

Tabla 1. Cuadro de variables. Variable dependiente: F/B, variables independientes: DLM, TN y TA.

6.6. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Dado que el análisis principal se realizó a partir de la relación entre la puntuación percentilar del Peso/Longitud y el índice firmicutes/bacteroidetes, se calculó el tamaño de la muestra para una correlación a dos colas con una significancia de 0.05, una β de 0.20 y un coeficiente de correlación esperado de 0.50, dando como resultado una N de 30 ⁽⁴⁹⁾.

El análisis secundario se realizó a partir del siguiente modelo de regresión múltiple:

$$F/B \sim DLM + TN + TA$$

Se incluyeron tres variables explicativas, con un grado de libertad cada una, haciendo un total de tres términos; considerando de diez a veinte repeticiones por término de acuerdo a Peduzzi y cols ⁽⁵⁰⁾, resultando en un total de 30-60 sujetos.

Para cumplir con ambos análisis se concluyó con una n de 30.

6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis descriptivo: Se describieron las medidas de resumen de cada variable, las de escala continua como media y desviación estándar si su distribución es normal y como mediana y rango intercuartílico si no lo es. Las variables discretas se reportaron como frecuencia y porcentaje.

Análisis inferencial: Se realizó a partir de correlación de Sperman, (relación del peso/longitud e índice firmicutes/bacteroidetes) y por un modelo de regresión múltiple para explicar la variabilidad del índice firmicutes/bacteroidetes.

El modelo de regresión múltiple fue:

$$F/B \sim DLM + TN + TA$$

Se realizó selección escalonada de las variables significativas según Harrell, y se determinó Eta² para dichas variables.

Por Análisis de la Varianza (ANOVA), se compararon las medias en la transformación logarítmica del índice Firmicutes/Bacteroidetes de acuerdo con el diagnóstico del estado de nutrición.

6.8. CONCORDANCIAS EN LAS MEDICIONES (CONTROL DE CALIDAD).

Para asegurar el control de calidad de en las mediciones de los parámetros antropométricos, todas las mediciones fueron tomadas por el mismo investigador y por triplicado, reduciendo así las posibles fuentes de error.

6.9. ASPECTOS ÉTICOS.

El presente estudio fue sometido y aceptado por el Comité Estatal de Ética, y al Comité de Ética en Investigación en Salud del ISSSTE en San Luis Potosí, priorizando la integridad, respeto, dignidad, bienestar y protección a los derechos de las personas de investigación (Cartas de aceptación en el anexo 2).

Se diseñaron: consentimiento informado y aviso de privacidad (Anexo 3 y 4), mismos que fueron firmados por ambos padres o tutores de los lactantes seleccionados otorgando el consentimiento a ser participantes de esta investigación. La firma se realizó con la plena comprensión del estudio sin la influencia de los investigadores o terceras personas.

El manejo de los datos fue exclusivo de los investigadores a cargo, preservando la confidencialidad de toda la información recabada en un lugar seguro, con especial cuidado de no divulgar cualquier dato.

6.10. PLAN DE TRABAJO.

1. El protocolo fue presentado y aprobado por los comités: Estatal de Ética en Investigación y de Ética en Investigación del ISSSTE, con número de registro SLP/016-2017, 005/2018 respectivamente, (Cartas de aceptación, anexo 2).
2. Por conveniencia se seleccionaron estancias infantiles de la ciudad solicitando autorización para el acceso y desarrollo del protocolo; así como la invitación directa a población abierta por medio de trípticos que fueron aprobados por el Comité Estatal de Ética en Investigación (Anexo 5).
3. Posterior a la invitación, los padres de familia que aceptaron participar firmaron el consentimiento informado y el aviso de privacidad (Anexo 3 y 4).
4. Por entrevista directa a los padres se recolectaron los datos de moduladores ambientales, así como el registro de los indicadores antropométricos (Anexo 5 - 7).
5. Al final de la entrevista se solicitó la donación de un pañal para la toma de la muestra fecal.
6. Inmediatamente el pañal fue transportado al Laboratorio de Investigación Traslacional en Farmacología, manteniendo las condiciones adecuadas de preservación de la muestra (Temperatura: -20°C) para ser dividida en una alícuota de 1g cada una.
 - a. La primera alícuota se colocó en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL, y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento, para la extracción de DNA bacteriano.
7. De la primer alícuota se realizó la extracción de DNA bacteriano, para lo cual se estandarizó el protocolo de extracción (Anexo 8), y se comprobó con la amplificación del gen 16S, característico de las bacterias, por técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), (Anexo 9).
8. De la extracción de DNA, se realizó la cuantificación del índice Firmicutes/Bacteroidetes por PCR cuantitativa (qPCR), (Anexo 10).
9. Los datos se vaciaron en una hoja de cálculo de Excel® Versión 16.24 para su análisis en el programa estadístico R y RStudio versión 1.1.453.
10. Se generó el reporte de resultados.

VII. CAPITAL HUMANO Y RECURSOS MATERIALES.

7.1. Capital humano

- Estudiante en servicio social de la Licenciatura en Nutrición, quien apoyó en la recolección de los datos.
- Un estudiante de maestría, quien recolectó, procesó las muestras y analizó los datos.
- Un pediatra quien revisó la evaluación realizada a los lactantes.

7.2. Recursos económicos

- La investigación se financió a partir de una beca CONACYT para estudiante de maestría, con número de CVU: 828962
- Los recursos económicos fueron cubiertos por el Laboratorio de Investigación Traslacional en Farmacología de la Facultad de Medicina UASLP.

7.3. Recursos materiales

- Báscula pediátrica marca Beurer, capacidad mínima 100g y graduación de 5g.
- Infantómetro marca Seca, con rango de medición de 0-99cm y con división de mm.
- Cinta de antropometría marca Seca, de hasta 205cm y con división mm.

VIII. RESULTADOS.

8.1. Características basales de la población.

Se recolectaron 30 pacientes, con una proporción de 50 y 50% para cada sexo, con rango de edad entre uno y seis meses. La media de IMC fue de $16.2 \pm 1.9 \text{ Kg/m}^2$, en el percentil del IMC/E fue de 44.5 ± 30.7 , mientras que en el percentil P/L fue de 46.2 ± 30.6 , a partir de ellos el 13.3% de la población fue clasificado con sobrepeso u obesidad de acuerdo con los puntos de corte de la OMS (Tabla 1).

El 56.7% de los lactantes nacieron por parto vaginal, 23.3% refirieron recibir lactancia materna exclusiva, con un promedio de duración de 25.5 ± 90 días, el 33.3% recibió al menos una dosificación de antibióticos en los meses previos de ingreso al estudio con una duración de entre 5 a 10 días, y el 26.7% suplementación con algún producto con probióticos, prebióticos y/o simbióticos.

Variable	n=30
Sexo (Femenino)	50.0%
Edad (Meses)	4 ± 1.8
Índice de Masa Corporal	$16.2 \pm 1.9 \text{ Kg/m}^2$
Percentil de IMC/E	44.5 ± 30.7
Percentil de P/L	46.2 ± 30.6
% Peso/Longitud	99.7 ± 10.1
Sobrepeso/Obesidad (IMC/E)	13.3%
Sobrepeso/Obesidad (P/L)	13.3%
Tipo de nacimiento (Parto)	56.7%
Días de LM	$25.5 \pm 90.0^*$
Patrón alimentario (LM)	23.3%
Toma de antibióticos	33.3%
Días de toma de antibiótico	$0.0 \pm 7.0^*$
Suplementación	26.7%
Índice Firmicutes/Bacteroidetes	$0.8 \pm 3.1^*$
Log IF/B	-0.6 ± 4.2

Tabla 2. Descripción de las variables antropométricas y los moduladores ambientales de la microbiota intestinal en la población estudiada. Las variables marcadas con * se presentan como mediana y rangos intercuartílicos. IMC/E: Índice de Masa Corporal para la Edad., P/L: peso para la longitud., LM: lactancia materna exclusiva. Log IF/B: Logaritmo del Índice Firmicutes/Bacteroidetes.

Respecto al índice Firmicutes/Bacteroidetes, la transformación logarítmica mostró una media de -0.6 ± 4.2 en Unidades de Abundancia Relativa.

8.2. Relación del índice Firmicutes/Bacteroidetes y la puntuación percentilar del peso/longitud.

Se realizó el análisis de la relación entre el índice Firmicutes/Bacteroidetes en transformación logarítmica y la puntuación percentilar del Peso/Longitud, mediante correlación de Spearman, se determinó una Rho de 0.093 (IC -0.27 a 0.43) $p=0.623$, observándose una relación ligeramente positiva no significativa estadísticamente (Figura 1).

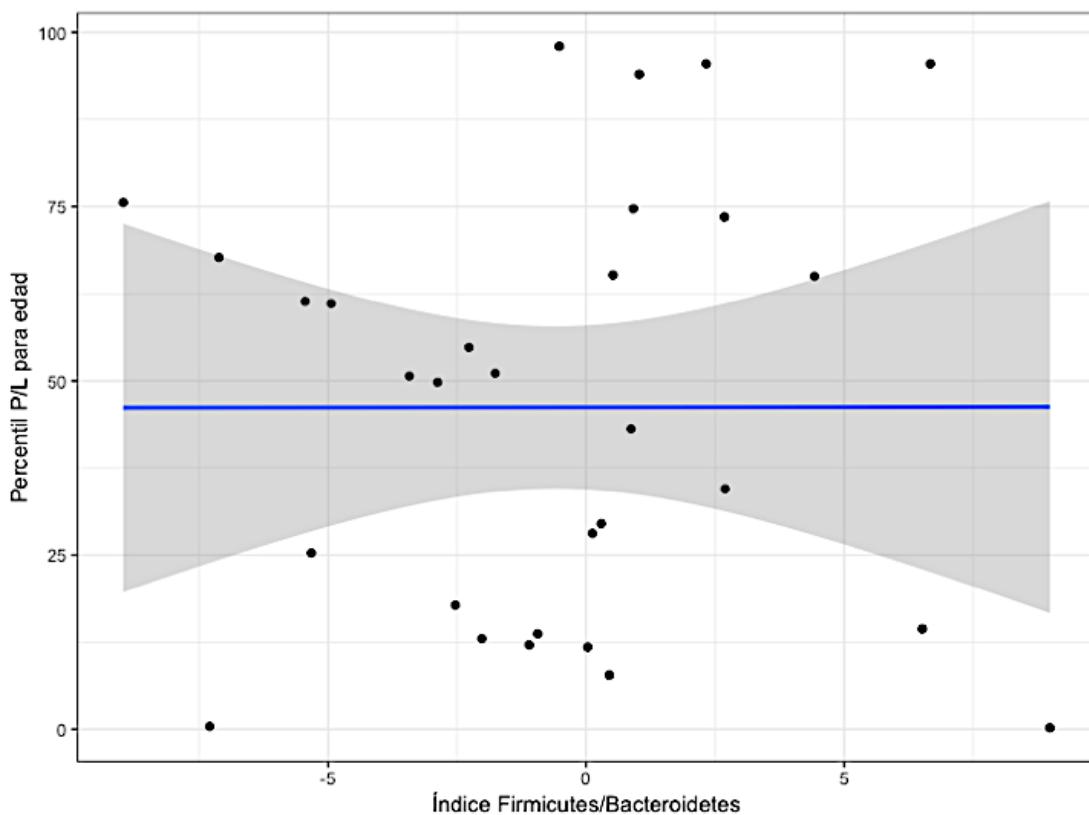


Figura 2. Relación del percentil P/L y el índice Firmicutes/Bacteroidetes, Rho de Spearman 0.093 (IC-0.27 a 0.43) $p=0.623$.

8.3. Índice Firmicutes/Bacteroidetes y sus moduladores ambientales.

Por análisis de regresión lineal múltiple se evalúo la variabilidad del índice Firmicutes/Bacteroidetes en escala logarítmica, explicado por los moduladores ambientales: Tipo de nacimiento, días de lactancia materna exclusiva, y días de toma de antibióticos (Tabla 2).

Variable	Estimado	Error estándar	Valor p	Eta ²
Nacimiento (Parto)	3.217	1.545	0.047*	0.142
Días de LM	-0.003	0.011	0.799	0.002
Días de Toma de AB	-0.061	0.208	0.769	0.003

Tabla 3. Modelo de regresión lineal que explica la variabilidad en el índice de Firmicutes/Bacteroidetes en escala log. R^2 ajustada 0.064, valor $p=0.197$.

En este modelo la variable nacimiento por parto vaginal, muestra asociación positiva con el índice Firmicutes/Bacteroidetes ($p=0.047$, $\eta^2= 0.14$), el modelo completo no mostró significancia estadística y una $\eta^2= 0.19$.

Debido a estos resultados se desarrolló otro modelo explicando la variabilidad del índice Firmicutes/Bacteroidetes en escala logarítmica explicado por edad (meses), tipo de nacimiento y suplementación de prebióticos, probióticos y simbióticos.

De este modelo las variables edad (meses) y nacimiento (parto vaginal) se relacionan con el índice Firmicutes/Bacteroidetes ($p=0.029$ y 0.019 , respectivamente), en el caso de la suplementación con prebióticos, probióticos y simbióticos, no se logró visualizar la significancia estadística con este modulador.

El modelo completo logró explicar el 26.1% de la variabilidad de la escala logarítmica del índice Firmicutes/Bacteroidetes, con un valor de $p= 0.012$.

A partir de este modelo (Tabla 3), se realizó el ajuste del índice Firmicutes/Bacteroidetes, para evaluar nuevamente la relación con la puntuación percentilar de Peso/Longitud.

Variable	Estimado	Error estándar	Valor p	Eta²
<i>Edad</i>	-0.895	0.390	0.029*	0.168
<i>Nacimiento (Parto)</i>	3.399	1.369	0.019*	0.191
<i>Suplementación (Sí)</i>	2.905	1.569	0.075	0.116

Tabla 4. Modelo de regresión lineal para ajuste de la variabilidad en el índice de Firmicutes/Bacteroidetes. Escala log. **R² ajustada 0.261, valor p=0.012.**

8.4. Relación índice Firmicutes/Bacteroidetes ajustado y la puntuación percentilar de peso/longitud.

Con el ajuste de la variable índice Firmicutes/Bacteroidetes se evaluó la relación con la puntuación percentilar Peso/Longitud, obteniéndose una Rho de Spearman 0.118 (IC -0.25 a 0.45, $p=0.531$), mejorando la relación a pesar de observar que los intervalos de confianza cruzan la unidad perdiendo la significancia estadística (Figura 2).

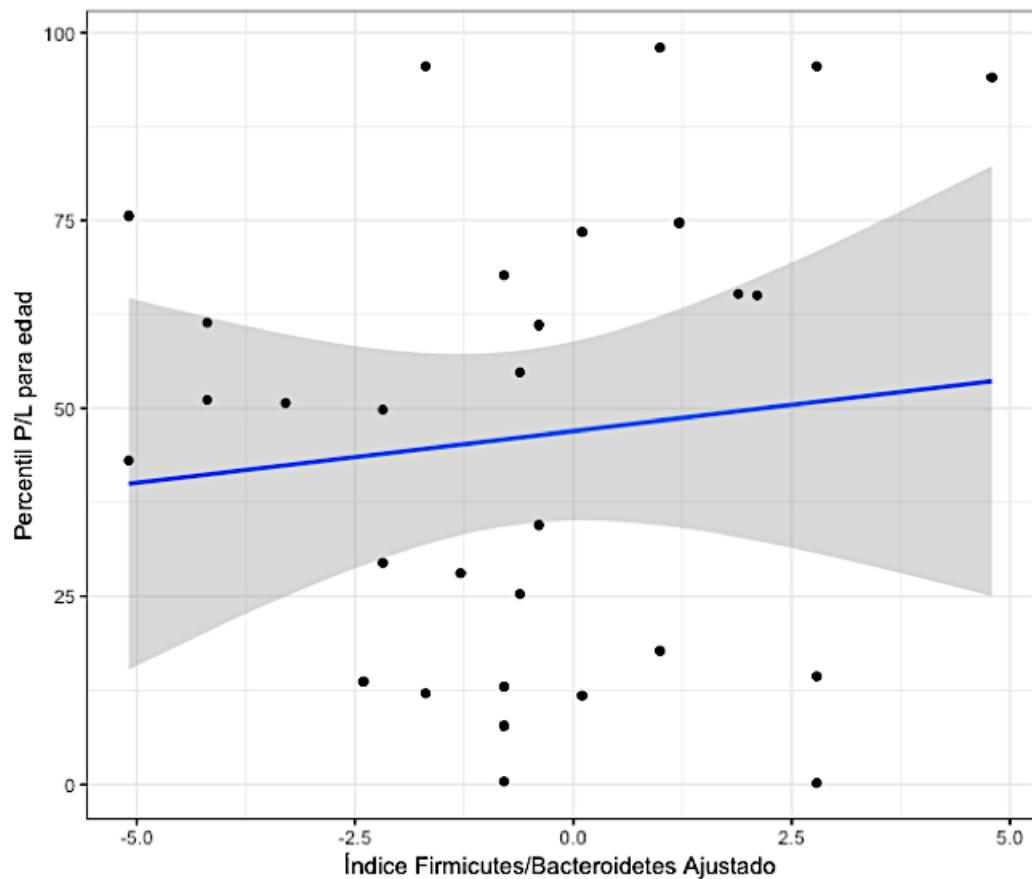


Figura 3. Relación del percentil P/L y el índice Firmicutes/Bacteroidetes, Rho de Spearman 0.118 (IC-0.25 a 0.45) $p=0.531$.

8.5. Relación del índice Firmicutes/Bacteroidetes ajustado y el porcentaje del peso/longitud. Índice de Waterlow.

Se evaluó la relación del índice con el porcentaje del peso para la longitud, de acuerdo con lo propuesto por Waterlow. Este resultado fue similar a al reportado con la puntuación percentilar peso/longitud, con una Rho de Spearman 0.118 (IC -0.25 a 0.45, $p=0.557$), sin obtenerse significancia estadística (Figura 3).

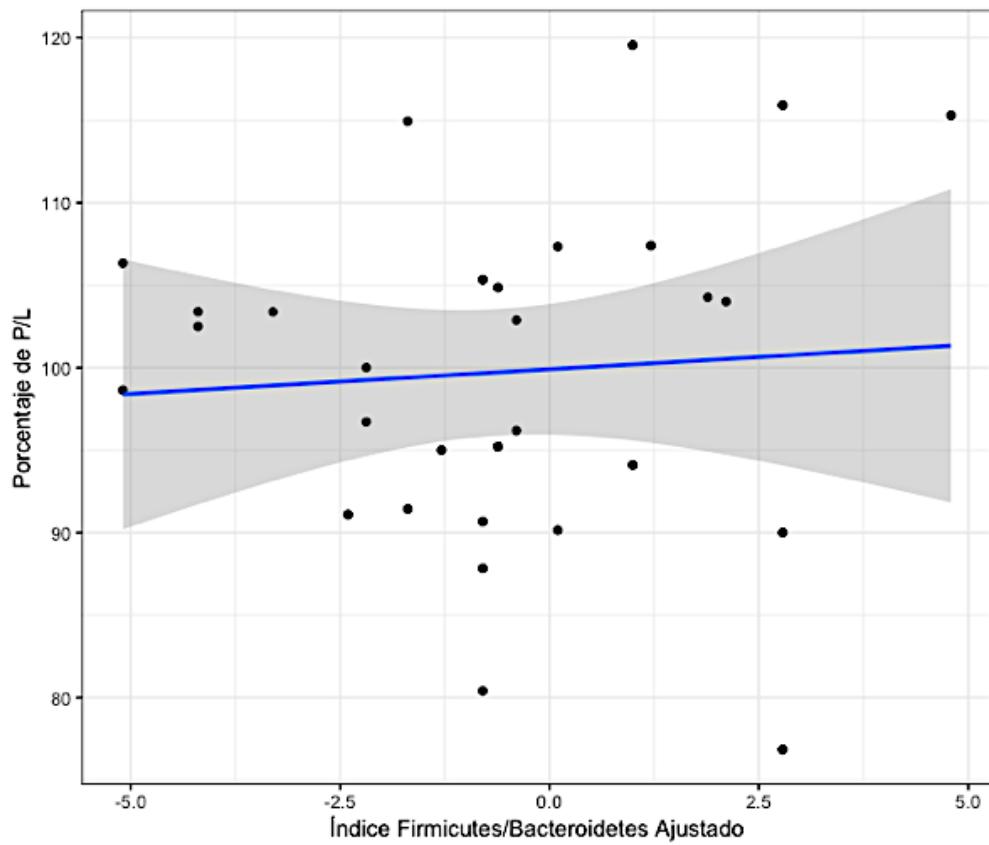


Figura 4. Relación del porcentaje P/L (Índice de Waterlow) y el índice Firmicutes/Bacteroidetes, Rho de Spearman 0.118 (IC-0.25 a 0.45) $p=0.557$.

8.6. Comparación del índice Firmicutes/Bacteroidetes de acuerdo con el estado de nutrición con los puntos de corte para P/L propuesto por la OMS.

De acuerdo con la distribución gráfica observada en el análisis previo se realizó la comparación del índice Firmicutes/Bacteroidetes entre las clasificaciones del estado de nutrición. Se identificó una frecuencia combinada de sobrepeso y obesidad de 13.3%, para el caso de desnutrición una frecuencia de 6% y resto un estado de nutrición normal (Tabla 4).

Grupo	n (%)	Índice
		Firmicutes/Bacteroidetes
<i>Desnutrición</i>	2 (6%)	0.994 ± 2.533 UAR
<i>Peso normal</i>	24 (80%)	-1.119 ± 2.17 UAR
<i>SBP/Obesidad</i>	4 (13.3%)	1.720 ± 2.75 UAR

Tabla 5. Índice Firmicutes/Bacteroidetes de acuerdo con las clasificaciones del estado de nutrición. Se presenta media y desviación estándar. UAR. Unidades de Abundancia Relativa.

A partir de la comparación entre las clasificaciones del estado de nutrición se observaron valores mayores en ambos extremos de la malnutrición (Desnutrición y Sobre peso/Obesidad), en comparación con el estado de nutrición normal; sin embargo, estas diferencias no lograron ser estadísticamente significativas. (Desnutrición Vs Estado normal $p=0.646$, Sobre peso/Obesidad Vs Estado normal $p=0.084$) (Figura 4).

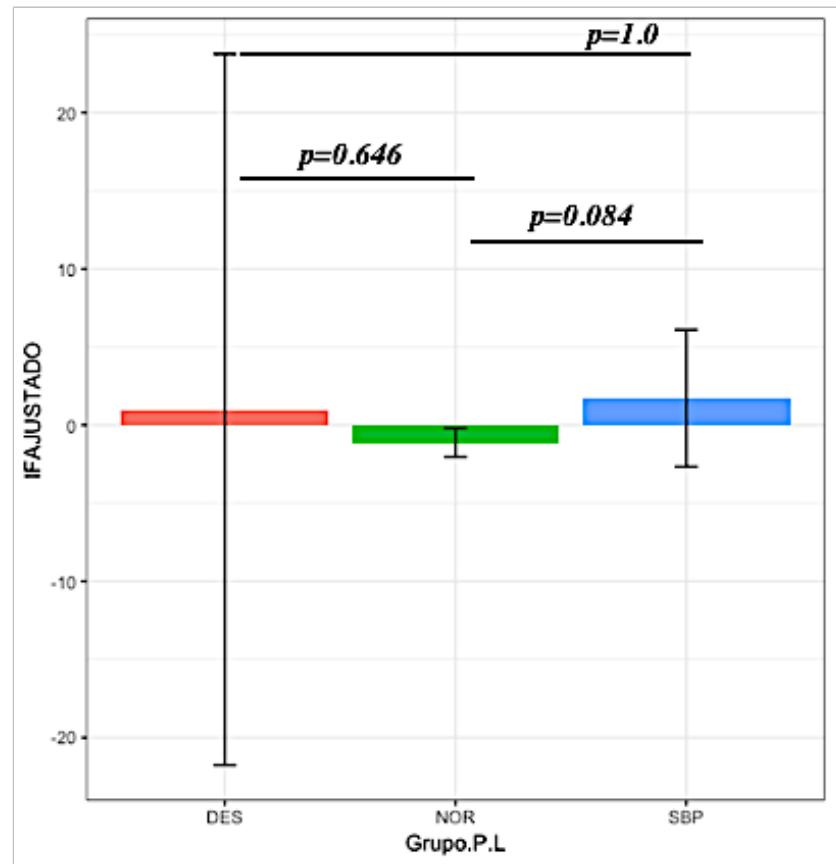


Figura 5. Análisis de la Índice Firmicutes/Bacteroidetes de acuerdo con el estado de nutrición. Se presenta media y desviación estándar. UAR. Unidades de Abundancia Relativa.

9. DISCUSIONES.

El incremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, ha generado gran interés en el estudio de mecanismos fisiopatológicos que contribuyan en la explicación del incremento de esta epidemia, y en el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento.

En esta línea, se ha identificado la importante participación importante de la microbiota intestinal en el incremento del peso corporal⁽⁵¹⁾, así como el uso de estrategias moduladoras de consumo de prebióticos, probióticos y simbióticos para la reducción del peso corporal⁽⁵²⁾; sin embargo, poco se ha estudiado del papel del ambiente microbiano en el desarrollo de sobrepeso y obesidad en edades tempranas de la vida. Es así como la realización de este trabajo aportará conocimientos a los vacíos en esta línea de investigación en población pediátrica.

Se logró la recolección de 30 lactantes menores, con una proporción 50% para cada sexo, asegurando una adecuada representación de ambos, situación no necesaria, ya que las diferencias sexuales en esta etapa temprana de la vida no afectan en el perfil microbiano intestinal⁽³⁶⁾.

En nuestra muestra, el 6% de la población presentó desnutrición de acuerdo con el puntaje percentilar de peso/longitud y el punto de corte propuesto por la OMS. Esta frecuencia es mayor en 2.2 puntos porcentuales a la reportada en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición a Medio Camino 2016 (ENSANUT-MC 2016),⁽⁵³⁾ para menores de cinco años esto debido al muestreo por conveniencia que hemos realizado. Situación similar sucedió en el diagnóstico de sobrepeso y obesidad, donde el 13.3% de la población se ubicó en este grado, en comparación con lo reportado en la ENSANUT-MC 2016 de 6.15%⁽⁴⁶⁾.

Al comparar con la frecuencia de sobrepeso/obesidad en niños de guarderías de Baja California Sur, nuestros datos reportan 4 puntos porcentuales por debajo del mostrado en las guarderías (17.3% Vs 13.3%)⁽⁴⁷⁾. Si bien en un inicio se consideró a esta población como blanco en la realización de nuestro estudio, al final de este la mayor proporción de nuestros lactantes menores no asistían a dichos servicios y recibían en mayor medida un patrón alimentario caracterizado por lactancia materna exclusiva

(23.3%). Esta frecuencia es de destacar, ya que es mayor a la reportada en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2012 (ENSANUT 2012), donde sólo el 14.4% de los menores de seis meses recibían lactancia materna exclusiva^(54,55).

Así como la lactancia materna es un modulador de la microbiota intestinal, el tipo de nacimiento, toma de antibióticos y toma de suplementos que contienen probióticos, prebióticos y/o simbióticos son moduladores importantes. En México, de acuerdo con el reporte de la ENSANUT 2012, la resolución de los nacimientos por parto vaginal ha disminuido del 70% en el 2000 al 54.9% en el 2012⁽⁵⁵⁾, siendo menor a lo identificado en nuestra muestra, donde el 56.7% de los lactantes fueron nacidos por parto vaginal. En nuestros resultados se documentó que 33.3% de la muestra tomó antibióticos en los meses previos a la entrevista, con una duración de 7 a 10 días por ocasión.

A partir de la influencia de estos moduladores, se identificó una media de 0.8 ± 3.1 en el índice Firmicutes/Bacteroidetes; sin embargo, como se comentó en el apartado de antecedentes, no se cuenta actualmente con información similar para los rangos de edad reportado en nuestro estudio. En el estudio de Estrada-Velasco et al, en escolares mexicanos, se reportó una media en el índice Firmicutes/Bacteroidetes de 0.8 para el grupo de estado de nutrición normal y 2.15 para el grupo de sobrepeso/obesidad⁽⁷⁾. En adultos jóvenes ucranianos, Koliada et al, reportaron una media 0.8 para el estado de nutrición normal, incrementándose dicha media al incrementarse el IMC, 1.3 para sobrepeso y 1.6 para obesidad⁽⁵⁶⁾. En adultos mayores españoles, Haro et al, reportaron un índice de 1.25 en sujetos con IMC menor a 30, 1.35 en sujetos con IMC entre 30-33; y 1.15 en pacientes con IMC >33⁽⁵⁷⁾.

La evidencia actual, ha identificado que los moduladores influyen en el perfil de la microbiota intestinal y a su vez en el posible efecto del estado de salud y nutrición^(7,51,58,59). Por ello se realizaron los modelos de regresión lineal donde se identificó que el tipo de nacimiento, edad del lactante y la suplementación con probióticos, prebióticos y/o simbióticos, explican de forma adecuada la variabilidad del índice Firmicutes/Bacteroidetes.

Si bien en nuestro estudio no se identificó significancia estadística, pero pareciera presentarse una posible relación positiva, que, de acuerdo con lo reportado en estudios

previos, un mayor índice Firmicutes/Bacteroidetes, se relaciona a mayor incremento de peso, tanto en escolares, adolescentes y adultos⁽⁷⁾; siendo nuestro estudio de los primeros en documentar dicha relación en lactantes menores de seis meses. Es así que para confirmar estos resultados se deben de realizar un recálculo del tamaño muestral, ya que nuestro cálculo se basó en una relación esperada de 0.30.

Dentro del análisis de nuestros resultados, parece que en ambos extremos de la malnutrición (desnutrición y sobrepeso/obesidad), se presentaban niveles mayores del índice Firmicutes/Bacteroidetes en comparación con el grupo de estado de nutrición normal. Si bien estos resultados no fueron estadísticamente significativos y los grupos no se encontraban balanceados, pero estos hallazgos irían de la mano con lo mostrado en estudios previos, como los de Fluitman et al⁽⁶⁰⁾, y Million et al⁽⁶¹⁾, describiendo disminución en la diversidad bacteriana, bacterias del filo bacteroidetes y aumento en bacterias del filo Firmicutes. Así como se reportan esos hallazgos, Gordon et al⁽⁶²⁾, y de Clercq et al⁽⁶³⁾, identificaron que en la microbiota intestinal de niños desnutridos, se presentaban algunos genes relacionados a una mayor síntesis de micronutrientos (complejo B), explicando así que la microbiota podría participar modulando el efecto del déficit alimentario en la desnutrición.

Sin embargo, los resultados reportados en los estudios previos corresponden a datos de niños con desnutrición grave, proveniente de países catalogados como de bajos o muy bajos ingresos, siendo así que nuestro estudio es uno de los primeros en identificar dicha característica en una población proveniente de una zona urbana con una prevalencia de desnutrición baja, siendo de especial interés identificar continuar la línea de investigación y explorar esta característica.

De igual forma, el aumentar el tamaño muestral, así como incluir a una población con mayor variabilidad entre los moduladores ambientales de la microbiota intestinal (tipo de nacimiento, toma de lactancia materna, toma de antibióticos, uso de suplementación y otros), nos permitiría confirmar si estos influyen de alguna manera en la variabilidad del índice Firmicutes/Bacteroidetes; así como su efecto en el estado de nutrición y salud de lactantes menores. Esto es de especial interés, ya que no fue posible estudiar el efecto de muchos otros moduladores de la microbiota intestinal.

10. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS.

Para cumplir con el objetivo principal de este estudio, se diseñó una técnica de extracción de DNA bacteriano, proveniente de muestra fecal, así como una técnica para la determinación del índice Firmicutes/Bacteroidetes por medio de qPCR, esto a partir de técnicas previamente reportadas en la literatura, siendo una medición subrogada de la riqueza bacteriana y el perfil de la microbiota intestinal.

Si bien la medición de dicho índice ya se había realizado por qPCR con anterioridad es importante mencionar que es una técnica que brinda menor información que la Secuenciación Masiva de Segunda Generación (NGS), lo que podría haber influido en los resultados encontrados en nuestro estudio.

Una siguiente limitante identificada en este trabajo fueron los grupos no balanceados entre las distintas clasificaciones del estado de nutrición, teniendo el mayor porcentaje en estado de nutrición normal, así como un agrupamiento muy similar entre los factores moduladores de la microbiota intestinal.

Otra limitante importante, es el sesgo de memoria en los padres de los lactantes menores participantes quienes, a pesar de realizarse por entrevista directa, mostraron dificultades para recordar algunas de los datos solicitados en el llenado del formato de recolección de datos.

Sabiendo que estas limitantes se pueden atender de forma adecuada en el análisis de los resultados, encontramos las perspectivas de continuidad de la línea de investigación.

- De acuerdo con las ligeras diferencias entre los grupos del estado de nutrición, se recalcó la muestra para así poder identificar de forma certa si el índice Firmicutes/Bacteroidetes está elevado en ambos extremos del estado de nutrición. Se obtuvo una n de 16 sujetos por grupos, a partir del recálculo con la fórmula *Power Calculation for Balanced One-Way Analysis of Variances Tests*, con una varianza entre-sujetos de 17.42, una variabilidad intra-sujeto de 51.66, con un poder de 80% y significancia estadística de 0.05.

11. CONCLUSIONES.

Se determinó el el índice Firmicutes/Bacteroidetes con una media de -0.6 ± 4.2 , en su transformación logarítmica. La media de la puntuación percentilar del peso para la longitud fue de 46.2 ± 30.6 , clasificando al 13.3% de los lactantes menores con sobrepeso u obesidad.

El patrón principal de los moduladores ambientales de la microbiota intestinal se caracterizó por nacimientos por parto vaginal (56.7%), lactancia materna exclusiva (23.3%), toma de antibióticos (33.3%) y la toma de suplementación con prebióticos, probióticos y/o simbióticos (26.7%).

Los moduladores que influyen en la variabilidad del índice Firmicutes/Bacteroidetes fueron: tipo de nacimiento, suplementación y edad del lactante, moduladores por los cuales se ajustó el índice Firmicutes/Bacteroidetes y se realizó el análisis de relación con la puntuación percentilar de peso/longitud, con un resultado de Rho de Spearman de 0.118 (IC -0.25 a 0.45, $p=0.531$).

En la identificación de las limitantes del estudio se logró comparar el índice Firmicutes/Bacteroidetes entre los grupos clasificados por el estado de nutrición, observándose que en extremos de la malnutrición se presentan ligeramente mayores niveles del índice Firmicutes/Bacteroidetes, resultados no estadísticamente significativos, pero que son una característica de especial interés para la continuidad de esta línea de investigación.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Putignani L, Del Chierico F, Petrucca A, Vernocchi P, Dallapiccola B. The human gut microbiota: a dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Pediatr Res.* 2014;76(1):2–10.
2. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis.* 2015;26:26050.
3. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(34):13780–5.
4. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial flora. *Science.* 2005;308(5728):1635–1638.
5. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes V, Sokol H, Doré J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 2009;9(1):123.
6. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* junio de 2008;3(6):1101–8.
7. Estrada-Velasco BI, Cruz M, García-Mena J, Salgado AV, Romero JP, Guna Serrano MDLR, et al. La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre firmicutes y el consumo de alimentos con alto contenido energético. *Nutr Hosp.* 2015;31(3):1074–1081.
8. Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2009;98(2):229–238.
9. Hu J, Nomura Y, Bashir A, Fernandez-Hernandez H, Itzkowitz S, Pei Z, et al. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PLoS ONE.* 2013;8(11).
10. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis.* 2015;26:26050.
11. Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2009;98(2):229–38.
12. Marques TM, Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Ryan CA, Stanton C. Programming infant gut microbiota: Influence of dietary and environmental factors. *Curr Opin Biotechnol.* 2010;21(2):149–56.
13. Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, Ulaszewska M, Jeffery IB, O'Shea CA, et al. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome.* 2017;5(1):21.
14. van Best N, Hornef MW, Savelkoul PHM, Penders J. On the origin of species: Factors shaping the establishment of infant's gut microbiota. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev.* 2015;105(4):240–51.
15. Backhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe.* 2015;17(5):690–703.
16. Marko Kalliomäki, Maria Carmen Collado, Seppo Salminen and El. Early

- differences in fecal microbiota composition in children may. *Am J Clin Nutr.* 2008;1(1):534–8.
17. Huang L, Chen Q, Zhao Y, Wang W, Fang F, Bao Y. Is elective cesarean section associated with a higher risk of asthma? A meta-analysis. *J Asthma.* 2015;52(1):16–25.
 18. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics.* 2006;118(2):511–21.
 19. Hooper L V. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(5):367–74.
 20. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol.* 2007;19(2):70–83.
 21. Heikkila MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol.* 2003;95(3):471–8.
 22. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr.* 2012;96:544–51.
 23. Meropol SB, Edwards A. Development of the infant intestinal microbiome: A bird's eye view of a complex process. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev.* 2015;105(4):228–39.
 24. Savino F, Roana J, Mandras N, Tarasco V, Locatelli E, Tullio V. Faecal microbiota in breast-fed infants after antibiotic therapy. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2011;100(1):75–8.
 25. Fouhy F, Guinane CM, Hussey S, Wall R, Ryan CA, Dempsey EM, et al. High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):5811–20.
 26. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal Microbiota of 6-week-old Infants Across Europe: Geographic Influence Beyond Delivery Mode, Breast-feeding, and Antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51(1):77–84.
 27. Stokholm J, Schjørring S, Eskildsen CE, Pedersen L, Bischoff AL, Følsgaard N, et al. Antibiotic use during pregnancy alters the commensal vaginal microbiota. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(7):629–35.
 28. Ajslev TA, Andersen CS, Gamborg M, Sørensen TIA, Jess T. Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *Int J Obes.* 2011;35(4):522–9.
 29. Trasande L, Blustein J, Liu M, Corwin E, Cox LM, Blaser MJ. Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *Int J Obes.* 2013;37(1):16–23.
 30. Cox LM, Blaser MJ. Antibiotics in early life and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(3):182–90.
 31. Laursen MF, Zachariassen G, Bahl MI, Bergström A, Høst A, Michaelsen KF, et al. Having older siblings is associated with gut microbiota development during early childhood. *BMC Microbiol.* 2015;15(1):154.

32. Penders J, Gerhold K, Thijs C, Zimmermann K, Wahn U, Lau S, et al. New insights into the hygiene hypothesis in allergic diseases: Mediation of sibling and birth mode effects by the gut microbiota. *Gut Microbes*. 2014;5(2):239–44.
33. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poulet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(33):14691–6.
34. Grześkowiak Ł, Collado MC, Mangani C, Maleta K, Laitinen K, Ashorn P, et al. Distinct Gut Microbiota in Southeastern African and Northern European Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(6):812–6.
35. Yatsunenko T, Rey FE, MAnary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222–7.
36. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8836–8847.
37. Shivaji S. We are not alone: a case for the human microbiome in extra intestinal diseases. *Gut Pathog*. 2017;9(1):13.
38. Chan YK, Estaki M, Gibson DL. Clinical consequences of diet-induced dysbiosis. *Ann Nutr Metab*. 2013;63(SUPPL.2):28–40.
39. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718–23.
40. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(4):894–9.
41. Le Huërou-Luron I, Blat S, Boudry G. Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr Res Rev*. 2010;23(01):23–36.
42. Gueimondea M, Laitinena K, Salminena S, Isolauric E. Breast milk: A source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*. 2012;92(2):64–6.
43. Estrada-Velasco BI, Cruz M, García-Mena J, Salgado AV, Romero JP, Guna Serrano MDLR, et al. La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre firmicutes y el consumo de alimentos con alto contenido energético. *Nutr Hosp*. 2015;31(3):1074–81.
44. Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methé B a, Zavadil J, Gao Z, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*. 2012;488(7413):621–6.
45. Hernández-Cordero,S. Editorial. *Salud Pública México*. 2014;56(Suppl 2):S99–100.
46. Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Gaona-Pineda EB, Gómez-Acosta LM, Morales-Rúan MaríaDC, Hernández-Ávila M, et al. Sobre peso y obesidad en niños y adolescentes en México, actualización de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Salud Pública México*. el 4 de mayo de 2018;60(3, may-jun):244.
47. Álvarez-Villaseñor AS, George-Flores V. Sobre peso y obesidad en niños de guarderías. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. :4.

48. WHO | BMI-for-age [Internet]. WHO. [citado el 29 de abril de 2018]. Disponible en: http://www.who.int/childgrowth/standards/bmi_for_age/en/
49. Designing clinical research : an epidemiologic approach. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
50. Peduzzi P, Concato J, Feinstein AR, Holford TR. Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis II. Accuracy and precision of regression estimates. *J Clin Epidemiol*. 1995;48(12):1503–10.
51. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718–23.
52. Marques TM, Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Ryan CA, Stanton C. Programming infant gut microbiota: Influence of dietary and environmental factors. *Curr Opin Biotechnol*. 2010;21(2):149–156.
53. Shamah-Levy T, Cuevas Nasu L, Rivera Dommarco J, Hernández Ávila, Mauricio. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. 2016 p. 149.
54. de Cosío TG, González-Castell LD. Prácticas de alimentación infantil y deterioro de la lactancia materna en México. *Salud Pública México*. 2013;55:10.
55. Gutiérrez,JP, Rivera-Dommarco, J, Shamah-Levy,T, Villalpando-Hernández, S, Franco, A, Cuevas-Nasu, L, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales [Internet]. Instituto Nacional de Salud Pública (MX); 2012 [citado el 12 de junio de 2018]. Disponible en: <https://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
56. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol* [Internet]. diciembre de 2017 [citado el 28 de mayo de 2019];17(1). Disponible en: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-1027-1>
57. Haro C, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, Gómez-Delgado F, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, et al. Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. Sanz Y, editor. *PLOS ONE*. el 26 de mayo de 2016;11(5):e0154090.
58. Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, Ulaszewska M, Jeffery IB, O’Shea CA, et al. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome*. 2017;5(1):21.
59. Ajslev TA, Andersen CS, Gamborg M, Sørensen TIA, Jess T. Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *Int J Obes*. 2011;35(4):522–529.
60. Fluitman KS, De Clercq NC, Keijser BJF, Visser M, Nieuwdorp M, IJzerman RG. The intestinal microbiota, energy balance, and malnutrition: emphasis on the role of short-chain fatty acids. *Expert Rev Endocrinol Metab*. el 4 de mayo de 2017;12(3):215–26.
61. Million M, Diallo A, Raoult D. Gut microbiota and malnutrition. *Microb Pathog*. mayo de 2017;106:127–38.
62. Gordon JI, Dewey KG, Mills DA, Medzhitov RM. The Human Gut Microbiota and Undernutrition. *Sci Transl Med*. el 6 de junio de 2012;4(137):137ps12-137ps12.

63. de Clercq NC, Groen AK, Romijn JA, Nieuwdorp M. Gut Microbiota in Obesity and Undernutrition. *Adv Nutr Int Rev J.* noviembre de 2016;7(6):1080–9.
64. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc.* 2003;62(01):67–72.
65. Hooper LV. Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science.* 2001;291(5505):881–884.
66. Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. *BioMed Res Int.* 2015;2015.
67. Clayton TA, Baker D, Lindon JC, Everett JR, Nicholson JK. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(34):14728–14733.
68. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol.* 2011;12(1):21–27.
69. Chung H, Pamp SJ, Hill JA, Surana NK, Edelman SM, Troy EB, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell.* 2012;149(7):1578–1593.
70. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010;12(5):319–330.
71. Hooper LV. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(5):367–374.
72. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol.* 2007;19(2):70–83.
73. Lutgendorff F, Akkermans LM a, Söderholm JD. The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage. *Curr Mol Med.* 2008;8(4):282–298.
74. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15451–15455.

ANEXO 1. FUNCIONES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Función de la microbiota intestinal	Características
<i>Metabolismo de nutrientos</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fermentación de oligosacáridos no digeribles por el ser humano, para producir ácidos grasos de cadena corta (butirato, propionato y acetato)(64) 2. Bloquea la inhibición de la actividad de la lipoproteinlipasa en adipocitos y la bacteria <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> aumenta la eficiencia de la hidrólisis lipídica, regulando la expresión de la colipasa; requerida por la lipasa pancreática para la digestión de los lípidos (65) 3. Algunas bacterias del género <i>Lactobacillus</i> participan en la degradación de proteínas y en la conversión de aminoácidos a moléculas de señalización y péptidos antimicrobianos.(36) 4. Síntesis de algunas vitaminas del complejo B y vitamina K. 5. Metabolización y activación de polifenoles (36,66,67).
<i>Inmunomodulación</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. En conjunto con el sistema inmune innato y adaptativo: produce y activa células del tejido linfoide asociado al tubo digestivo (GALT), células T, células B, células linfoides innatas grupo 3 (ILCs Group 3), macrófagos y células dendríticas (68,69).
<i>Función antimicrobiana</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. En el intestino grueso: produce moco, constituido de glicoproteínas y mucinas secretadas por las células caliciformes, que mantiene a los microbios en el lumen intestinal lejos del contacto epitelial. en intestinal lejos del contacto epitelial, predominantemente en el intestino grueso (70). 2. En el intestino delgado: induce la síntesis de proteínas antimicrobiales: catelicidinas y lectinas tipo C, a través sus componentes estructurales y metabolitos (71,72).
<i>Integridad de la barrera intestinal y estructura del TGI</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. La bacteria <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>, induce la expresión de <i>Proteína Pequeña Rica en Prolina 2A</i>, necesaria para mantener los desmosomas de las vellosidades intestinales (73). 2. Desarrollo de la mucosa intestinal, induciendo al Factor de Transcripción Angiogénica 3; involucrado en el desarrollo de la microvasculatura intestinal(74).

Tabla 1. Funciones de la microbiota intestinal en la fisiología del hospedador.

ANEXO 2. CARTAS DE ACEPTACIÓN DE LOS COMITÉS DE ÉTICA



F-54724
S-84035

DIRECCIÓN: DE ATENCIÓN MÉDICA
 DEPARTAMENTO: EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD
 DOMICILIO: PROLONG. CALZADA DE GUADALUPE No. 5850
 COL. LOMAS DE LA VIRGEN, C.P. 78380
 NUMERO DE OFICIO:
 EXPEDIENTE: 1682 031027

ASUNTO: Evaluación de Protocolo Registro Estatal
 SLP/016-2017.

01 DIC. 2017
 San Luis Potosí, S.L.P.,

DR. ALEJANDRO JAVIER ZERMEÑO GUERRA
 DIRECTOR DE LA FACULTAD DE MEDICINA
 DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
 AV. VENUSTIANO CARRANZA No. 2405
 COL. LOS FILTROS, C.P. 78210
 CIUDAD.

AL CONTESTAR ESTE OFICIO CITENSE LOS DATOS
 CONTENIDOS EN EL ANGULO SUPERIOR DERECHO
 Hago de su conocimiento que con fecha 27 de noviembre del 2017, en sesión ordinaria el Comité Estatal de Ética en Investigación en Salud, se realizó la Evaluación del Protocolo de Investigación:

"Relación del Índice Firmicutes/Bacteroidetes, sus Moduladores Ambientales y la Composición Corporal de Lactantes Menores."	L.N Rafael Antonio Almendra Pegueros.
"Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí"	
REGISTRO ESTATAL SLP/016-2017	

Siendo el dictamen por consenso:

OPINIÓN TÉCNICA FAVORABLE

Lo anterior, con fundamento en el TÍTULO QUINTO de la Ley Estatal de Salud, que establece las bases, condiciones y normatividad en materia de Investigación para la Salud y la NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de Proyectos de Investigación para la Salud en Seres Humanos.

En base a la Guía Nacional para la Integración y Funcionamiento de los Comités de Ética en Investigación y el Reglamento Interno del Comité Estatal de Ética en Investigación, Capítulo X, artículo 45, el Investigador titular se obliga como parte de los compromisos adquiridos, a entregar con periodicidad los avances cuando el comité lo determine y en su momento el informe final de la Investigación al Comité Estatal de Ética en Investigación en Salud.

Reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE
 SUFRAGIO EFECTIVO NO REELECCIÓN
 LA DIRECTORA GENERAL

DRA. MÓNICA LIZIÁN RANGEL MARTÍNEZ.

SERVICIOS DE SALUD
 DE SAN LUIS POTOSÍ

01 DIC. 2017
 DEPARTAMENTO
 OFICIAZIA DE PARTES

JMUL/GRJA/GOV

2017 "Un siglo de las Constituciones"

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL ISSSTE.

 <p>ISSSTE INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO</p>	<p>COMITÉ DE INVESTIGACIÓN DEL ISSSTE SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.</p>	<p>COMITÉ DE INVESTIGACIÓN</p> 		
<p>PRESIDENTE DRA. YADIRA ANGÉLICA CHÁVEZ GONZÁLEZ, MSP</p> <p>SECRETARIO TÉCNICO LIC. ENF. Y DBST. JUAN MIGUEL SÁNCHEZ ZAVALA</p> <p>VOCALES:</p> <p>DRA. MARÍA EUGENIA GARCÍA SEGURA</p> <p>DR. EMANUEL RIVERA LÓPEZ ESP. MED. INT. Y END.</p> <p>DR. VÍCTOR MANUEL GARCÍA SAUCEDO</p> <p>L.E. NASARIA GONZÁLEZ REYES, MAAE</p> <p>L.E. VIRGINIA DÍAZ PATIÑO</p> <p>LEO DIANA DEL CARMEN MUÑÍZ MARTÍNEZ</p> <p>L.E. MARY CRUZ LEJÁ RODRÍGUEZ, MAAE</p> <p>DR. SALVADOR LÓPEZ MEZA MSP</p> <p>DRA. MÓNICA ACOSTA DÍAZ DE LEÓN</p> <p>L.N. ALLISON YAMILÉ GÓMEZ RODRÍGUEZ</p> <p>DR. JUAN FRANCISCO NEGRETE TORRES</p> <p>L.N. SOFÍA ESCAREÑO BARRERA</p> <p>AVAL CIUDADANO: C. MARÍA DEL CARMEN FLORES GÓMEZ</p>				
<p>San Luis Potosí, S.L.P., a 11 de Abril 2018</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">ASUNTO: DICTAMEN</td> </tr> <tr> <td style="width: 50%;">REGISTRO INTERNO N° 007-18 C.I</td> </tr> </table> <p>RAFAEL ANTONIO ALMENDRA PEGUEROS PRESENTE:</p> <p>Por éste conducto le informo que el día 11 de abril de 2018 se realizó la reunión ordinaria del Comité de Investigación en el aula de enseñanza del Hospital General del ISSSTE, en donde se realizó el dictamen de su protocolo de investigación denominado “Relación del índice firmicutes/bacteroidetes, sus moduladores ambientales y la composición corporal de lactantes menores” y al realizar el análisis por los integrantes de la comisión evaluadora se dictaminó como:</p> <p style="text-align: center;"><u>ACEPTADO PARA SU IMPLEMENTACIÓN</u></p> <p>Por lo que puede iniciar con la investigación según su cronograma de actividades y sin más que agregar a la presente me despido de usted.</p> <p style="text-align: center;">Atentamente:</p> <p style="text-align: center;">  DRA. YADIRA ANGÉLICA CHÁVEZ GONZÁLEZ, MSP PRESIDENTE COMITÉ DE INVESTIGACIÓN HOSPITAL GENERAL ISSSTE SLP </p>			ASUNTO: DICTAMEN	REGISTRO INTERNO N° 007-18 C.I
ASUNTO: DICTAMEN				
REGISTRO INTERNO N° 007-18 C.I				

 ISSSTE <small>INSTITUTO DE SALUD SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO</small>	COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN ISSSTE, SAN LUIS POTOSÍ REG. COFEPRIS: EN TRÁMITE	Comité de Ética en Investigación San Luis Potosí 
SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P., 11 de abril del 2018		
ASUNTO: <u>ACEPTACION DE PROTOCOLO</u>		
REGISTRO INTERNO: 005/2018		
<p>PRESIDENTE L. E. NASARIA GONZÁLEZ REYES</p> <p>SECRETARIA TÉCNICA L.E. VIRGINIA DÍAZ PATIÑO</p> <p>VOCALES:</p> <p>DRA. YADIRA ANGÉLICA CHÁVEZ GONZÁLEZ</p> <p>DRA. MÓNICA ACOSTA DIAZ DE LEÓN</p> <p>L.N. SOFÍA ESCARÉNO BARRERA</p> <p>DR. VÍCTOR MANUEL GARCÍA SAUCEDO</p> <p>DRA. MARÍA EUGENIA GARCÍA SEGURA</p> <p>L.N. ALLISON YAMILÉ GÓMEZ RODRÍGUEZ</p> <p>L. E. MARY CRUZ LEIJA RODRÍGUEZ</p> <p>DR. SALVADOR LÓPEZ MEZA</p> <p>LEO DIANA DEL CARMEN MUÑÍZ MARTÍNEZ</p> <p>DR. EMMANUEL RIVERA LÓPEZ</p> <p>L. E. O. JUAN MIGUEL SÁNCHEZ ZAVALA</p> <p>AVAL CIUDADANO:</p> <p>MARÍA DEL CARMEN FLORES GÓMEZ</p>		
<p>L.N. Rafael Antonio Almendra Pegueros</p> <p>PRESENTE</p> <p>A través de este medio se hace de su conocimiento que, con fecha 11 de abril del presente año, en sesión ordinaria, se dictamino el protocolo denominado "Relación del índice firmicutes/bacteroidetes, sus moduladores ambientales y la composición corporal de lactantes menores"</p> <p>el cual queda en calidad de:</p> <p style="text-align: center;"><u>ACEPTADO PARA SU IMPLEMENTACIÓN</u></p> <p>Por lo que puede proceder con la aplicación del mismo de acuerdo con su descripción de cronograma de actividades presentado.</p> <p style="text-align: center;">ATENTAMENTE</p> <p style="text-align: center;">  L. E. NASARIA GONZÁLEZ REYES, M.A.A.E. PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN </p>		
<p>CONTACTOS: Correo: comiteissstesp@hotmail.com </p>		

ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Medicina - Maestría en Ciencias en Investigación Clínica

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Con fundamento en la Ley General de Salud Título Quinto Capítulo Único.

Investigación para la Salud Art. 102 y 103.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título Segundo Capítulo I.

De los aspectos Éticos de la investigación en Seres Humanos.

Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012,

Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para Salud en seres humanos.

Título del estudio. **Relación del Índices Firmicutes/Bacteroidetes, sus moduladores ambientales y el percentil del IMC/E en lactantes menores.**

Nombre de los investigadores principales	LN. Rafael Antonio Almendra Pegueros D. en C. Úrsula Fabiola Medina Moreno
Institución	Dpto. de Epidemiología Clínica, Laboratorio de Investigación Traslacional en Farmacología, Facultad de Medicina, U.A.S.L.P.
Teléfono de contacto	LN. Rafael Antonio Almendra Pegueros 444 323 0522

Estimado (a) parente/madre del menor: _____.

Se le está invitando a participar en el presente estudio de investigación, titulado: “**Relación del Índices Firmicutes/Bacteroidetes, sus moduladores ambientales y el percentil del IMC/E en lactantes menores**”, de manera gratuita. La participación de su hijo (a) en este estudio es totalmente voluntaria.

A continuación, en este formato de consentimiento informado se le dará a conocer el objetivo y propósito de esta investigación, cada uno de los procedimientos que se realizarán, beneficios, riesgos conocidos, molestias, precauciones del estudio incluyendo la duración y la naturaleza de su participación. Para obtener el consentimiento informado, es necesario que usted entienda cada palabra aquí escrita y en cualquier momento que tenga alguna duda, estará en la absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto relacionado al protocolo o sus procedimientos.

Usted tiene el derecho de solicitar que su hijo (a) sea retirado del estudio en cualquier momento, sin que por ello, se perjudique su atención en el centro de atención, guardería o estancia: (nombre del centro): _____

Para que pueda formar parte de este proyecto es necesario que una vez aclarada todas sus dudas, usted firme y feche este documento con la presencia de dos testigos y posteriormente recibirá una copia del mismo.

La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), a través de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica; está realizando este proyecto de investigación el cual tiene como **objetivo**:

Relacionar el índice Firmicutes/Bacteroidetes, sus moduladores ambientales con la puntuación percentilar del Índice de Masa Corporal para la edad en lactantes menores.

Propósito (Justificación) de la investigación.

Actualmente nuestro país presenta un aumento en los casos de sobrepeso y obesidad infantil; condicionando a que estos niños presenten enfermedades como diabetes, hipertensión arterial y problemas metabólicos a corta edad. Junto a lo anterior se ha encontrado relación entre las bacterias que habitan los intestinos (microbiota intestinal), con los casos de sobrepeso y obesidad.

La participación de su hijo contribuirá al estudio de esta relación, de la cual, en un futuro se podrán crear estrategias de prevención y tratamiento del sobrepeso y obesidad.

Tipo de intervención a realizarse en el proyecto.

Su hijo (a) ha sido seleccionado ya que cumple con las siguientes características: tiene 6 meses de edad, reside en la ciudad de San Luis Potosí, no presenta alguna enfermedad y nació a término (nacido a partir de las 36 semanas de gestación). En caso de que su hijo (a) no cumpla con los criterios antes mencionados es necesario lo notifique.

Procedimientos:

Si usted acepta que su hijo (a) participe en este estudio, ocurrirá lo siguiente:

1. Responderá un cuestionario que incluye preguntas referentes a la gestación, y nacimiento de su hijo; preguntas referentes a la alimentación (tipo, frecuencia) y toma de antibióticos en los últimos seis meses.
2. A su hijo se le realizarán los siguientes procedimientos menores:
 - a. Antropometría: Se le medirá el peso corporal, talla, circunferencia abdominal y circunferencia cefálica. El peso será tomado con un tallímetro portátil especial para lactantes. El peso corporal con una báscula calibrada y autorizada para su uso en lactantes. Las circunferencias serán tomadas con cinta métrica, calibrada para dichas mediciones.

Para los procedimientos anteriores se requiere que su hijo se encuentre con la menor cantidad de ropa, así como con un pañal seco. Estos procedimientos son seguros, no invasivos y se realizan por personal capacitado.

3. Se le solicitará una muestra fecal de su hijo, misma que deberá ser tomada en la mañana en la cual se realice la medición. Para ello se le entregará un manual de cómo hacer la toma de muestra y un reservorio en cual deberá contenerla y entregarla el día de las mediciones. Esta muestra nos permitirá conocer la composición de bacterias del intestino de su hijo (a) (microbiota intestinal).
4. Las muestras fecales de su hijo serán conservadas para estudios futuros derivados del presente estudio, en los cuales se realizará la extracción de ADN (material genético de las bacterias presentes en el intestino). Los cuales se realizarán en el año inmediato a la toma y se secuenciará el gen 16S (propio de bacterias).

Beneficios: Si usted acepta que su hijo (a) participe en el estudio, recibirá de beneficio el control del niño sano de su hijo (a) mismo que es requerido por la **NOM-008-SSA2-1993, Control de la nutrición crecimiento y desarrollo del niño y del adolescente. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio**, y será avalado por un médico pediatra, entregándole un reporte de los resultados sin costo. Además, su participación contribuirá a la investigación de la obesidad y sus comorbilidades en edad pediátrica; ya que se trata de un problema de salud importante a nivel mundial.

Confidencialidad: Los datos personales recabados serán protegidos, incorporados y tratados con fundamento en el Art. 4/o. de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos donde establece el derecho a la protección de la salud que tiene toda persona; Artículos 1/o., 23, 24, 32 y 33 principalmente de la Ley General de Salud que establece las bases y modalidades para el acceso a los servicios de salud; Artículos 8, 9 y 10 del Reglamento General de Salud, en materia de prestación de servicios de atención médica; Artículo 20 de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información pública gubernamental y Artículo 48 de su reglamento, cuya finalidad es integrar un registro que proporcione la capacidad de definir con precisión y diligencia la situación clínica del paciente; y la NOM-004-SSA3-2012 del expediente clínico, relativa a la confidencialidad de la información contenida en el mismo el cual fue registrado en el listado del sistema de datos personales ante el Instituto Federal de Acceso a la Información Pública (www.ifai.org.mx) y podrán ser transmitidos de conformidad con lo previsto

por la Ley de la materia. Lo anterior se informa en cumplimiento del Art. 17 de los lineamientos generales de protección de datos personales, publicados en el Diario Oficial de la Federación el 30 de septiembre del año 2005.

Toda la información que usted nos proporcione referente a la situación de su hijo (a), será de carácter estrictamente confidencial y será utilizada sólo por el grupo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Su hijo (a) quedará identificado (a) con un número y no con su nombre. Las muestras fecales son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación sus muestras no podrán serle devueltas. Es posible que las muestras fecales de su hijo, así como la información que se obtengan como resultado de este proyecto puedan ser usadas en proyectos relacionados con este estudio. Si queda algo de la muestra se podrá conservar por los investigadores hasta por cinco años.

Riesgos potenciales/compensación: Los riesgos potenciales que puede tener este estudio son mínimos. Si alguna pregunta le hicieran sentir un poco incómodo (a), tiene el derecho de no responderla. En la toma de muestra fecal; así como en las mediciones explicadas en el procedimiento número 2, no existen riesgos potenciales que puedan dañar la integridad de su hijo (a). Sin embargo, es necesario mencionar que todas las mediciones serán realizadas por profesionales capacitados. Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio, pero tampoco implicará algún costo para usted.

Participación Voluntaria/Retiro: La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse que su hijo (a) participe, así como de retirar su participación del mismo en cualquier momento. Sin que esto afecte la atención que se le brinde a su hijo (a) en este guardería o estancia infantil.

Números a contactar: Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación respecto al proyecto, por favor comuníquese con el investigador responsable del proyecto: LN. Rafael Antonio Almendra Pegueros al siguiente número de teléfono: 444 323 0522. Si usted tiene preguntas generales relacionadas con sus derechos como participante de un estudio de investigación puede comunicarse con el coordinador del Comité Estatal de Ética en Investigación: Dr. Antonio Gordillo Moscoso al teléfono 01 444 826 2342 ext. 6688 en un horario de 9:00-13:00 hrs. Si usted acepta que su hijo (a) participe en el estudio, le entregaremos una copia de este documento que le pedimos sea tan amable de firmar. La investigación es un proceso largo y complejo, el obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios meses o inclusive años.

He leído el contenido de esta hoja de consentimiento, y se me ha dado una copia de la misma. Mi firma en este documento que soy mayor de edad, que tengo la capacidad legal para consentir y consiento la participación de mi hijo (a) en el estudio.

Nombre y firma del padre o madre:
(Fecha y hora)

Nombre y firma testigo 1:
(Fecha y hora)

Nombre y firma del investigador:
(Fecha y hora)

Nombre y firma testigo 2:
(Fecha y hora)

San Luis Potosí, S.L.P a _____ de _____ del 2017.

ANEXO 4. AVISO DE PRIVACIDAD.

AVISO DE PRIVACIDAD

Con fundamento en la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares Capítulo II de los Principios de Protección de Datos Personales artículo 15 y 16 ley publicada en el diario oficial de la federación el 5 de julio de 2010.

POR FAVOR LEA CUIDADOSAMENTE Y DE FORMA RESPONSABLE, LA PROTECCIÓN DE SUS DATOS PERSONALES

Para efecto de oír y recibir todo tipo de notificaciones con respecto a los derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición o revocación contenidos VII, VIII y IX del presente aviso de privacidad, se le proporciona los siguientes datos de contacto:

Título del estudio: Relación de la composición de la microbiota intestinal, sus modulares ambientales y la composición corporal de lactantes de San Luis Potosí.

Investigadores responsables: LN. Rafael A. Almendra Pegueros, M. en C. América Susana Mares García y Dra. en C. Úrsula Fabiola Medina Moreno.

Institución: Dpto. de Epidemiología Clínica, Laboratorio de Investigación Traslacional en Farmacología, Facultad de Medicina, U.A.S.L.P.

Contacto: LN. Rafael A. Almendra Pegueros. Tel. Cel. 444 323 0522

INFORMACIÓN QUE SE LE SOLICITARÁ:

Su información personal será utilizada con la finalidad de: *Relacionar el perfil de la microbiota intestinal con la composición corporal de lactantes a los seis meses de edad; y asociar la composición de la microbiota intestinal con sus moduladores ambientales*, para lo cual requerimos obtener los siguientes datos personales: *nombre, dirección y número de teléfono*, así como otros datos considerados como sensibles de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares, tales como: *tipo de nacimiento de su hijo, toma de leche materna, toma de antibióticos, estado de salud previo y actual*.

Es importante que usted sepa que todo el equipo de investigación que colabora en este estudio se compromete a que todos los datos proporcionados por usted sean tratados bajo medidas de seguridad y garantizando siempre su confidencialidad. En el caso de este proyecto las medidas que se tomarán para ello serán: *Peso, talla, circunferencia media de brazo, circunferencia de abdomen y análisis de la composición corporal para obtención del porcentaje de masa grasa*.

Usted tiene derecho de acceder, rectificar y cancelar sus datos personales, así como de oponerse almeno de los mismo o anular el consentimiento que nos haya otorgado para tal fin, presentando una carta dirigida al investigador principal: LN. Rafael A. Almendra Pegueros, Dpto. de Epidemiología Clínica, Laboratorio de Investigación Traslacional en Farmacología, Facultad de Medicina, U.A.S.L.P. Tel. Cel. 444 323 0522

DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD: Si usted no manifiesta oposición para que sus datos personales se compartan con las instancias mencionadas, se entenderá que ha otorgado su consentimiento para ello.

En caso de no estar de acuerdo favor de marcar en la siguiente línea.

No consiento que mis datos personales sean transferidos en los términos que señala el presente aviso de privacidad.

Nombre y firma autógrafa del titular: _____

San Luis Potosí, S.L.P. a _____ de _____ del 20____

ANEXO 5. FOLLETO DE INVITACIÓN.

¿Cuáles son mis beneficios al participar?

- Se les entregará el diagnóstico completo del estado de nutrición de su hijo, para identificar crecimiento y prevención de enfermedades.
- Se diseñará un manual de alimentación complementaria que irá de la mano con el estado de nutrición de su hijo, favoreciendo su crecimiento y para prevenir la presencia de enfermedades como sobrepeso y obesidad.

Por último nos ayudará a comprender un poco más de la epidemia del sobrepeso y obesidad infantil, para con ello poder plantear nuevas estrategias de prevención.



En caso de que existiera alguna duda, o deseara mayor información, le facilitamos los siguientes medios de comunicación.

LN. Rafael A. Almendra Pegueros
Estudiante de la Maestría en
Ciencias en Investigación Clínica
Facultad de Medicina, UASLP.

Tel. 01 444 826 2342 ext 6688
Tel. Cel. 444 323 0522
ralmendrap@gmail.com

Contamos con a colaboración de:
Dra. Úrsula Medina Moreno
Dr. Antonio Gordillo Moscoso

Dpto. de Epidemiología Clínica
Facultad de Medicina, UASLP.
Tel. 01 444 826 2342 ext 6688



Proyecto de investigación aprobado por el Comité Estatal de Ética en Investigación con número de registro: SLP016-2017

Relación del índice Firmicutes/Bacteroidetes sus moduladores ambientales y la composición corporal de lactantes menores

Facultad de Medicina, UASLP.

Participa con nosotros



Estimado padre de familia:

Te invitamos a participar en el protocolo de investigación **"Relación del Índice firmicutes/bacteroidetes, sus moduladores ambientales y la composición corporal de lactantes menores"**.

¿Te preguntarás por qué?



En el 2012 se reportó que en México, el 9.7% de **niños menores de 5 años** tenían sobrepeso u obesidad. (ENSANUT, 2012)

¿Por qué es importante para mí o mi hijo o hija?

La presencia de obesidad en edades temprana, aumenta el riesgo de padecer enfermedades como diabetes, presión alta, niveles elevados de colesterol y otras. Estas enfermedades disminuyen la calidad de vida y el óptimo crecimiento y desarrollo de los niños.

Actualmente se ha documentado la posible relación entre bacterias que se encuentran en nuestros intestinos con el desarrollo de sobrepeso y obesidad.



Por ello **buscamos** identificar la relación entre **bacterias intestinales** (firmicutes/bacteroidetes), con sus **moduladores ambientales** (tipo de nacimiento, lactancia materna, toma de antibióticos) y la presencia de



¿Mi hijo o hija puede participar?

1 Su pequeño debe CUMPLIR lo siguiente:

- Entre 40 días y 6 meses de edad
- No fue prematuro
- No tienen diagnóstico de ninguna enfermedad al nacimiento
- No presentan infección activa (diarrea al momento de la muestra)

Si cumple con las características anteriores por supuesto que sí



c) Los padres deberán contestar el cuestionario con información de los primeros días de vida de su pequeño. **NO HAY RESPUESTA MALA O BUENA**. Si existiera alguna duda estamos para apoyarlos.



El día de la toma de muestra **usted deberá**:

1. Devolver el cuestionario contestado.
2. Entregar el pañal dentro de una bolsita Ziploc que se les entregará previamente identificada.

¿Qué haremos nosotros?

1. Realizaremos medidas de Peso, talla, circunferencia de la cabeza y de brazo, para conocer el estado de nutrición de su pequeño.
2. El pañal que nos entregará será llevado al Laboratorio, donde tomaremos 4 partes de la muestra y se colocarán en contenedores adecuados para su procesamiento.
3. Procesaremos todos los datos de su hijo o hija para posterior entregarle los beneficios por participar.

Si acepta que su hijo participe favor de regresar esta parte con los siguientes datos:

Nombre de su hijo:

Nombre de mamá o papá:

Teléfono de contacto:

2 ¿Qué debo hacer si acepto que mi hijo o hija participe?

a) Ambos padres deberán leer y firmar el consentimiento informado y el aviso de privacidad.

b) Donar un pañal con la primera muestra fecal del día.

Si usted acepta, regrese la parte desprendible de este folleto y el día anterior a la toma de muestra se le enviará el cuestionario de información y el pañal que su hijo o hija usarán ese día para colectar la muestra fecal.

ANEXO 6. FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Formato de registro

“Relación del índice Firmicutes/Bacteroidetes, sus moduladores ambientales y la puntuación percentilar del IMC/E en lactantes menores”

Nombre: _____

Sexo: _____

Fecha de nacimiento: _____ Estancia: _____

Fecha de medición: _____

Indicadores antropométricos

Peso (Kg) _____

Talla (Cm) _____

Circunferencia abdominal (Cm) _____

Circunferenciacefálica (Cm) _____

Circunferencia media de brazo (Cm) _____

Índices antropométricos

IMC (Kg/m²) _____

IMC/Edad _____ (percentile) _____ (SD) _____

Talla/Edad _____ (percentile) _____ (SD) _____

Peso/Edad _____ (percentile) _____ (SD) _____

ICT (cm/cm) _____

Microbiota Intestinal

Índice Firmicutes/Bacteroidetes (Unidades de Abundancia Relativa)

Firmicutes: _____ Bacteroidetes: _____ IFB: _____

Formato de registro

“Relación del índice Firmicutes/Bacteroidetes, sus moduladores ambientales y la puntuación percentilar del IMC/E en lactantes menores”

Estimado parente/madre de familia, cómo usted recordará, en fechas anteriores se les invitó a participar en el protocolo de investigación: “**Relación del índice Firmicutes/Bacteroidetes, sus moduladores ambientales y la composición corporal de lactantes menores**”, y ya que su hijo cumple con los criterios de selección necesarios (específica cuáles), nos gustaría que pudieran contestar las siguientes preguntas que serán de interés en nuestro análisis.

Le recordamos que no existe respuesta buena o mala, y que de acuerdo con el consentimiento informado y aviso de privacidad que previamente firmó, los datos que usted nos proporcione, serán manejados con absoluta confidencialidad y sólo por los investigadores principales del proyecto.

En caso de que alguna pregunta le presente dificultad, favor de comunicarse con nosotros (444 323 0522 / LN. Rafael Almendra) o si prefiere facilitarnos algún número de teléfono donde nos podamos comunicar para orientarlo en el llenado de esta forma estaría excelente.

Padre/Madre de familia: _____

Número de teléfono: _____

Horarios en los que podemos llamarlo (a): _____

Nombre del lactante: _____

Sexo: _____

Fecha de nacimiento: _____ Estancia: _____

¿De cuantas semanas o meses nació su hijo(a)?: _____ Fue prematuro?: Si NO

¿Recuerda su peso y talla antes de embarazarse?

Peso de mamá: _____ (Kg). Peso de papá: _____ (Kg).

Talla de mamá: _____ (Cm). Talla de papá: _____ (Cm).

Antes del embarazo, ¿Mamá presentó alguna de las siguientes enfermedades?

Diabetes Si NO Hipertensión Si NO Colesterol alto Si NO
Triglicéridos altos Si NO

¿Recuerda su peso después del embarazo?

Peso de mamá: _____ (Kg).

Durante el embarazo, ¿mamá presentó alguna de las siguientes situaciones?

Diabetes gestacional Si ____ NO ____

Presión alta o Preeclampsia Si ____ NO ____

¿Su hijo(a), nació por parto natural o cesárea?: _____

¿Recuerda el peso y talla de su hijo(a) al nacimiento?

Peso al nacer: _____. Talla al nacer: _____

En el momento del parto, ¿su hijo presentó alguna enfermedad? Sí_ No

¿Cuál o cuáles?

¿En algún momento, su hijo tuvo lactancia materna exclusiva (es decir solo alimentación al seno materno sin complementar con otra leche)?

Sí: _____ No: _____

En caso de que respondiera sí:

¿Cuánto tiempo tuvo lactancia materna exclusiva? _____
meses

De acuerdo con la alimentación actual de su hijo seleccione la opción que crea se acerca a la realidad:

- Leche materna exclusiva _____
- Leche materna y otras leches _____
- Alimentos variados más leche materna _____
- Alimentos variados más otras leches _____
- Alimentos variados más leche materna y otras leches _____

¿En los últimos seis meses le ha dado antibióticos a su hijo(a)?

Sí _____ No _____

¿Recuerda cuantas ocasiones? ____ ¿Cuántos días por ocasión? _____

En caso de que respondiera que sí ¿recuerda cuales antibióticos?

¿En los últimos seis meses le ha dado probióticos a su hijo? Sí ___ No ___

¿Recuerda el nombre del probiótico? _____

¿En los últimos seis meses le ha dado prebióticos a su hijo? Sí ___ No ___

¿Recuerda el nombre del prebiótico? _____

¿En los últimos seis meses le ha dado simbióticos a su hijo? Sí ___ No ___

¿Recuerda el nombre del simbiótico? _____

¿En los últimos seis meses, su hijo consumió alguno de los siguientes productos? Seleccione con una equis cual o cuales.



¿Su hijo(a) tiene hermanos? Sí ___ No ___

¿Cuántos hijos tiene en total? _____

¿Qué número de hijo es el niño que forma parte del estudio? _____

ANEXO 7. EVALUACIÓN DEL ESTADO DE NUTRICIÓN EN EL LACTANTE MENOR.

La evaluación del estado de nutrición implica la interpretación de los datos obtenidos mediante diversos métodos como los dietéticos, bioquímicos, antropométricos y clínicos. Siendo esta, la actividad necesaria frente a la problemática actual de salud y nutrición presente en nuestro país. La evaluación y diagnóstico del estado de nutrición son una necesidad fundamental para planear y poner en funcionamiento acciones de intervención y vigilancia, en materia alimentaria.

En el lactante menor la evaluación del estado de nutrición puede realizarse por diversos métodos, siendo el antropométrico el mayormente utilizado. La antropometría es la evaluación de las variaciones en las dimensiones físicas y la composición corporal en diferentes edades y grados de nutrición.

La evaluación antropométrica está integrada por diversos indicadores, entre los que cabe destacar el peso, talla, diámetros y circunferencias, que a su vez forman parte de los índices antropométricos.

Peso.

Es la medición antropométrica más utilizada, ya que puede obtenerse con gran facilidad y precisión, siendo reflejo de la masa corporal total de un individuo, y es de suma importancia para monitorear el crecimiento de los niños reflejando el balance energético.

La técnica de medición del peso corporal en niños menores de 36 meses se realiza con una báscula de charola, en la cual el niño debe de colocarse en la zona central para distribuir su peso a lo largo de la bascula. El niño debe de ser medido con la menor cantidad de ropa posible y con un pañal limpio. El peso obtenido se registra a los 10g más cercanos y debe de realizarse en una báscula que permita una lectura mínima de 5g.

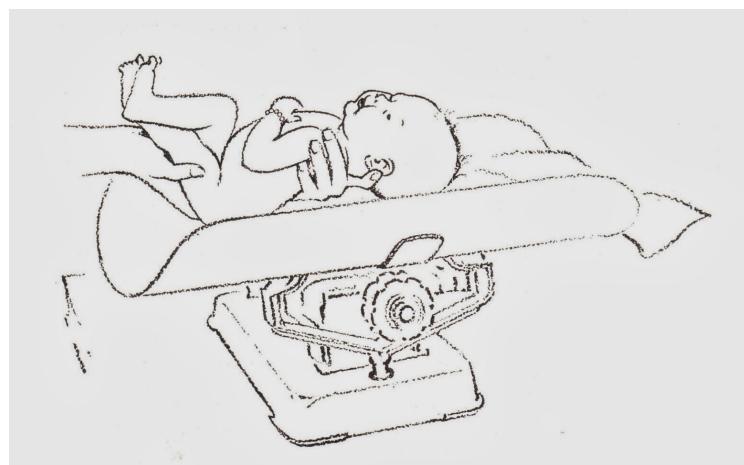


Imagen 1. Técnica de medición del peso corporal

Longitud supina o talla.

Esta medición se realiza en menores de dos años, aunque también puede utilizarse hasta los cuatro años, siendo un indicador del tamaño corporal y de la longitud de los huesos, tiene la ventaja de que no se ve alterado por situaciones como el estado hídrico y los cambios a largo plazo reflejan el estado de nutrición crónico.

Para esta medición se requiere de un infantómetro preciso, que cuente con dos cursores, uno fijo, que se orienta en la cabeza del paciente y otro móvil que se coloca en los pies.

El lactante deberá ser colocado en posición supina, con el cuerpo alineado en posición recta sobre el eje longitudinal del infantómetro, de manera que los hombros y la cadera tengan contacto con el plano horizontal y que los brazos se encuentren al lado del tronco. La coronilla de la cabeza debe tocar la base fija del infantómetro y debe estar colocada en el plano de Frankfort.

Se debe vigilar que al menos una pierna se encuentre estirada y toque con el talón en 90° el cursor móvil. La medición debe registrarse al 0.1cm más cercano.



Imagen 2. Técnica de medición de longitud supina

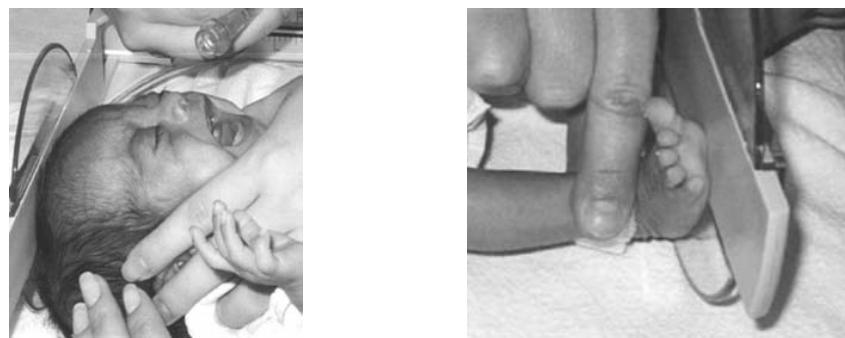


Imagen 3. Cabeza en posición de plano de Frankfort y pie en ángulo de 90°

Circunferenciacefálica o perímetrocefálico.

Es un indicador del desarrollo neurológico a partir de la evaluación indirecta de la masa cerebral, así como un indicador indirecto del estado de nutrición.

La técnica de medición indica que el paciente (lactante), debe de tener la cabeza libre de cualquier objeto y de preferencia sin contacto con la cuna o algún colchón.

El procedimiento se realiza con una cinta de fibra de vidrio de 1.0cm de grosor. La cual debe ser colocada en plano horizontal de tal manera que se encuentre a la misma altura en ambos lados de la cabeza, justo en el perímetro máximo de la cabeza, usando como referencia el punto máximo del occipucio y la glabela. Para el reporte de la medición, debe ejercerse una leve presión para comprimir el cabello y ligeramente la piel. La medición se aproxima al 0.1cm más cercano



Imagen 4. Técnica de medición del perímetrocefálico en la circunferencia máxima



Imagen 5. Técnica de medición del perímetrocefálico

Circunferencia de brazo.

Proporciona información sobre el contenido de masa muscular y masa grasa, dando referencia del crecimiento, desarrollo físico y del aumento de las reservas corporales, siendo un indicador sensible ante cambios rápidos de grasa subcutánea y de composición corporal.

Para la medición de este indicador, es necesario ubicar el punto medio del brazo, de preferencia en el brazo izquierdo. Para medirse el punto medio, debe doblarse el brazo

en un ángulo de 90° y mantenerlo pegado al tronco. Se toma como referencia el punto medio entre el acromion (hombro) y el olecranon (codo) en la parte externa del brazo.

Después con el brazo relajado y extendido en posición horizontal, ligeramente separado del tronco, se realiza la medición rodeando el contorno del brazo, sin ejercer presión.

La medición debe realizarse con una cinta de fibra de vidrio con presión de 1mm y grosor menor a 0.7cm. La cinta debe de quedar en plano perpendicular al tronco del cuerpo, registrando la medición al 0.1cm más cercano.



Imagen 6. Medición del punto medio del brazo.



Imagen 7. Medición de la circunferencia de brazo.

Índices y criterios de evaluación antropométrica en el lactante.

La transformación de los indicadores del estado de nutrición, en índices como el talla/edad, peso/edad, peso/talla e Índice de Masa Corporal (IMC)/edad, permiten la identificación adecuada de estados de deficiencia y por exceso.

Para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad en menores de dos años, se ha propuesto el uso de índices que relacionan peso y talla, peso para la talla (P/T) e IMC/Edad, siendo este último el que presenta una mejor identificación del riesgo a sobrepeso, sobrepeso y obesidad, así como una asociación significativa y directa con trastornos cardiovasculares y de resistencia a la insulina en la vida adulta.

La Organización Mundial de la Salud, ha sugerido que cuando la puntuación percentilar del IMC/Edad es igual o mayor a 85 identificaría sobrepeso u obesidad, con las siguientes divisiones:

DIAGNÓSTICO	PUNTUACIÓN PERCENTILAR	PUNTUACIÓN Z
OBESIDAD	>95	> +3
SOBREPESO	85-95	> +2
NORMAL	5-85	+1 a -2
BAJO PESO	<5	< -2

Tabla 1. Puntos de corte para IMC/Edad, de acuerdo a recomendaciones de la OMS

ANEXO 8. PROTOCOLO DE EXTRACIÓN DE DNA DE MUESTRA FECAL.

El protocolo aquí presentado fue adaptado del trabajo de Esther M Gabor y cols¹.

1. Colocar 1g de muestra fecal en un tubo para micro centrifuga de 2 mL. Y agregar 750 μ L de buffer de lisis. (100mM Trix-HCl, 100mM EDTA de sodio, 1.5M NaCl y 1% CTAB a un pH 8).
2. Mezclar con vórtex por 5 minutos a máxima velocidad.
3. Agregar 40 μ L de lisozima y 10 μ L de proteinasa K. Incubar por 30 minutos a 37°C.
4. Agregar 200 μ L de SDS al 20%.
5. Incubar a 65°C por 2 horas, con agitación manual vigorosa cada 30 minutos.
6. Centrifugar a 6000 giros por minutos durante 10 minutos. El sobrenadante es colocado en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
7. Al pellet residual del paso anterior, agregar 500 μ L de buffer de lisis, mezclar en vórtex por cinco segundos e incubar a 65°C por 10 minutos.
8. Centrifugar a 6000 giros por minutos durante 10 minutos. El sobrenadante es colocado en el tubo usado en el paso 7.
9. Repetir paso 7 y 8.
10. Al tubo de sobrenadantes agregar cloroformo en una relación 1:3 v/v y centrifugar 10min a 13 000 revoluciones por minuto (rpm).
11. Recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo para microcentrifuga de 1.5 mL y agregar 0.6 del volumen de la fase acuosa de isopropanol absoluto.
12. Incubar toda la noche a 4°C.
13. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante colocarlo en un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL nuevo.
14. Agregar 500 μ L de etanol al 70% y mezclar con vórtex por 5 segundos.
15. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos y desechar el sobrenadante.
16. Secar el pellet a 37°C por 2 horas o hasta que se logre visualizar un pellet seco.
17. Resuspender con 50 μ L de buffer de rehidratación o agua libre de RNAsa
18. Incubar a -20°C por 30 minutos.
19. Cuantificar con NanoDrop 2000 Thermo Scientific (espectrofotómetro, lectura realizada a una longitud de onda λ = 450 nm).

¹ Esther M Gabor, Erik J de Vries, Dick B Janssen; Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 44, Issue 2, 1 May 2003, Pages 153–163, [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00462-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00462-2)

ANEXO 9. PROTOCOLO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), PARA AMPLIFICACIÓN DE DNA BACTERIANO (16S)

Reactivos

GoTaq Polimerasa	12.5 μ L por reacción
MgCl	1.2 μ L por reacción
Primers 16s Forward	0.5 μ L por reacción
Primers 16s Reverse	0.5 μ L por reacción
BSA.	0.6 μ L por reacción
Agua libre de RNAsa	1.7 μ L por reacción
DNA.	8.0 μ L por reacción
Volumen final	25.0 μ L por reacción

Protocolo en termociclador¹.

- 4 minutos a 95°C
 - 1 minuto a 95°C (Desnaturalizado)
 - 1 minuto a 55°C (Alineamiento)
 - 40 segundos a 74°C (Extensión inicial)
 - 5 minutos a 74°C (Extensión final)
- 30 ciclos

¹Blanco-Jarvio, A., A. Martínez López & A. Bautista García. 2014. Optimización de un protocolo de extracción de DNA total para la amplificación de marcadores moleculares funcionales específicos de organismos desnitritificantes. *C/ICIMAR Oceánides*, 29(2): 37-44.

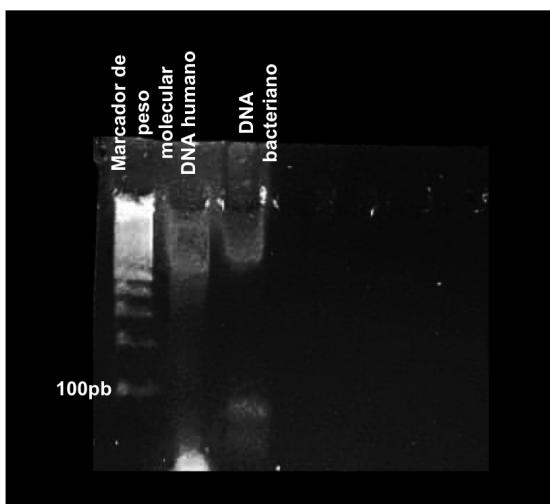


Figura 1. Gel de electroforesis (1%, 70V/1h)

ANEXO 10. CONDICIONES DE qPCR PARA CUANTIFICACIÓN DE UNIDADES DE ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS FILOS FIRMICUTES Y BACTEROIDETES.

Reactivos

qPCR Green Master	5 µL por reacción
Primer Forward	1 µL por reacción
Primer Reverse	1 µL por reacción
DNA	1 µL por reacción
Agua libre de RNAsa	2 µL por reacción
Volumen final	10.0 µL por reacción

Protocolo¹

- 2 minutos a 50°C
 - 5 minuto a 95°C
 - 15 segundos a 95°C
 - 15 segundos a 59°C
 - 15 segundos a 72°C
- } 50 ciclos

¹Protocolo adaptado del artículo: *Estrada-Velasco B et al. La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre firmicutes y el consumo de alimentos con alto contenido energético. Nutr Hosp. 2015;31(3):1074-1081.*

Grupo	Nombre	Secuencia	Concentración	TM
Universal	926Forward	5'AAACTCAAAGAATTGACGG3'	343 pmol/µL	60
	1062Reverse	5'CTCACRRACCGAGCTGAC3'	266 pmol/µL	68
Bacteroidetes	798cfbForward	5'CRAACAGGATTAGATAACCCT3'	393 pmol/µL	60
	Cfb967Reverse	5'GGTAAGGTTCCCTCGCGTAT3'	407 pmol/µL	62
Firmicutes	928F-Forward	5'TGAAACTYAAAGGAATTGACG3'	327 pmol/µL	62
	1040Reverse	5'ACCATGCACCACCTGTC3'	378 pmol/µL	64

Tabla 1. Pares de primer utilizados en la qPCR

