



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Análisis por PCR en tiempo real de alteraciones en la
microbiota intestinal de neonatos prematuros originadas
por la administración de antibióticos.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:
EDITH BUENDÍA CASTILLO

ASESORA: Dra. Gabriela González Pérez
COASESORA: M. en C. Paola Edith Briseño Lugo



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Análisis por PCR en tiempo real de alteraciones en la microbiota intestinal de neonatos prematuros originadas por la administración de antibióticos.

Que presenta la pasante: Edith Buendía Castillo

Con número de cuenta: 311027853 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Marzo de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
VOCAL	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
SECRETARIO	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Nydia Berenice González Ángeles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Reconocimiento

El presente trabajo fue desarrollado en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer-IER) en el departamento de desarrollo y fisiología celular bajo la dirección de la Dra. Gabriela González Pérez. Forma parte del proyecto: “Desenlaces clínicos en la etapa infantil asociados con cambios en el microbioma intestinal y la función inmune originados por la administración neonatal de antibióticos”. El proyecto es financiado con recursos del INPer (2017-2-61) y el Fondo Sectorial de Investigación en la Salud y Seguridad Social SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT que otorgo apoyo en modalidad de beca con clave SALUD-2017-2-289734.

*Dedicado a Rubén, Laly y David,
lo más importante en mi vida.*

Agradecimientos

A mis padres que me guían y apoyan en cada paso, son mi ejemplo a seguir...siempre los voy a admirar mucho. Gracias por todo su esfuerzo y sacrificios, este trabajo es tan mío como de ustedes. A David, mi compañero siempre, el mejor hermano que la vida pudo darme.

Carlos, gracias por todos tus consejos y tu apoyo a lo largo de este trabajo. Gracias por todas las enseñanzas, por ser parte de mi vida y hacerla más bonita, te amo.

A la UNAM y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, mi alma máter.

A la Dra. Gabriela González Pérez, gracias por la confianza para formar parte de su equipo de trabajo y ser parte de este proyecto. Por el apoyo y todas las enseñanzas.

A los sinodales que revisaron este trabajo por su tiempo y observaciones, y especialmente a mi asesora interna la M. en C. Paola Edith Briseño Lugo.

Índice

Índice figuras	1
Índice de tablas	2
Abreviaturas	3
1. Resumen	5
2. Introducción	6
3. Marco Teórico	8
3.1 Microbiota humana.....	8
3.2 Barrera intestinal	8
3.3 Composición de la MI.....	10
3.4 Funciones de la MI.....	10
3.5 Colonización de la MI.....	12
3.5.1 Antes del nacimiento.....	12
3.5.2 Después del nacimiento.....	13
3.5.2.1 Parto prematuro.....	14
3.5.2.2 Tipo de nacimiento	15
3.5.2.3 Tipo de alimentación.....	16
3.5.2.4 Prematurez, uso de antibióticos y origen de enfermedades	17
3.6 Administración de antibióticos neonatales en el INPer-IER	18
3.6.1 Características de los antibióticos neonatales usados en el INPer-IER	19
3.7 Caracterización de la microbiota	20
3.7.1 Características del gen 16S rDNA	20
3.7.2 Reacción de Cadena Polimerasa (PCR).....	21
3.7.3 PCR en tiempo real.....	22
4. Justificación.....	26
5. Objetivo general	27
5.1 Objetivos particulares.....	27
6. Hipótesis.....	28
7. Diseño experimental.....	29
7.1 Tipo de diseño y estudio:	29

7.1.1 Grupos de estudio:.....	29
7.2 Diagrama experimental	30
8. Materiales.....	31
8.1 Reactivos	31
8.2 Equipos	31
9. Metodología.....	32
9.1 Recolección y almacenamiento de las muestras de heces.....	32
9.2 Extracción de DNA de las muestras de heces	32
9.3 Cuantificación de DNA	33
9.4 Análisis de la MI neonatal mediante qPCR del gen 16S rDNA	34
9.4.1 Oligonucleótidos	34
9.4.2 Curva estándar	35
9.4.3 Mezcla de reacción qPCR	36
9.4.4 Condiciones qPCR.....	36
9.4.5 Electroforesis en gel de agarosa 2 %	36
9.5 Análisis estadístico.....	37
10. Resultados	38
10.1 Formación de la cohorte y características de los grupos de estudio.....	38
10.2 Validación de los oligonucleótidos Universal, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y <i>Enterobacteriaceae</i> por qPCR.....	40
10.3 Características de las muestras de heces neonatales analizadas	43
10.4 Análisis de la MI de neonatos prematuros mediante qPCR	46
11. Discusión.....	50
12. Conclusiones.....	55
13. Perspectivas.....	56
14. Referencias	57

Índice de figuras

Figura 1 Factores que influyen en la composición de la microbiota de un individuo.	8
Figura 2 Anatomía de las tres capas que conforman la barrera intestinal.	9
Figura 3 Densidad y composición de la microbiota del tracto GI.	10
Figura 4 Translocación bacteriana de la cavidad oral, intestino y vagina de la madre a ubicaciones intrauterinas.	12
Figura 5 Factores que intervienen en la colonización de la MI.	17
Figura 6 Subunidades y macromoléculas que conforman el ribosoma bacteriano.	21
Figura 7 PCR en tiempo real.	23
Figura 8 Análisis de la curva de disociación de qPCR.	25
Figura 9 Generación de curva estándar para la cuantificación de DNA por qPCR.	35
Figura 10 Curva de disociación correspondiente a los amplicones de los oligonucleótidos empleados.	40
Figura 11 Análisis de los productos de qPCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %.	41
Figura 12 Validación final de los productos de qPCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.	42
Figura 13 Diagrama de amplificación y curva estándar de los oligonucleótidos Universal.	47
Figura 14 Análisis de la MI de neonatos prematuros no tratados y tratados con antibióticos.	48

Índice de tablas

Tabla 1 Esquemas de antibióticos neonatales usados en el INPer-IER	19
Tabla 2 Características de los pares de oligonucleótidos	34
Tabla 3 Preparación de la mezcla de reacción de qPCR.....	36
Tabla 4 Condiciones de qPCR empleadas para el equipo Rotor-Gene Q	36
Tabla 5 Datos demográficos, antropométricos y clínicos de los grupos de estudio	39
Tabla 6 Validación de los oligonucleótidos para Actinobacteria y Bacteroidetes..	42
Tabla 7 Características de las muestras de heces neonatales	45
Tabla 8 Concentración y pureza de las muestras de DNA fecal de neonatos	46

Abreviaturas

AMK	Amikacina
AMP	Ampicilina
AMPs	Péptidos antimicrobianos
BLEE	β -lactamasas de espectro extendido
CEI	Células Epiteliales Intestinales
CLR	Claritromicina
Ct	Ciclo umbral
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos Trifosfato
DVEU	Días de Vida Extrauterina
ECN	Enterocolitis necrosante
GALT	Tejido Linfoide Asociado con el Intestino
GI	Gastrointestinal
GLP-1	Péptido 1 similar al glucagón
GOS	Galactooligosacáridos
HMO	Oligosacáridos de Leche Humana
IgA	Inmunoglobulina A
IgM	Inmunoglobulina M
INPer-IER	Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes
LA	Líquido amniótico
LH	Leche Humana
LPS	Lipopolisacárido
MDR	Multidrogo-resistente
MEM	Meropenem
MI	Microbiota Intestinal
NTC	Control de no templado
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
Pb	Pares de bases

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones
PYY	Péptido YY
qPCR	Reacción en Cadena Polimerasa en tiempo real
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
RN	Recién Nacido
RNasa	Ribonucleasa
RPM	Ruptura Prematura de Membranas
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SCFA	Ácidos Grasos de Cadena Corta
SDG	Semanas de Gestación
SI	Sistema inmunológico
SIgA	Inmunoglobulina A secretora
TBE	Tris, Borato, EDTA
Tm	Temperatura de fusión
TMA	Trimetilamina
TMAO	Trimetilamina N-óxido
TZP	Tazobactam-Piperacilina
UCIN	Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales
UCIREN	Unidad de Cuidados Intermedios al Recién Nacido
UV	Ultravioleta
VAN	Vancomicina

1. Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto a corto plazo del tratamiento con antibióticos en la microbiota intestinal de neonatos prematuros. Se recolectaron muestras de heces de neonatos tratados con antibióticos y sin tratamiento, durante su estancia hospitalaria en el INPer-IER. Se realizó una base de datos con antecedentes clínicos neonatales para clasificarlos en 4 grupos de estudio: un grupo control que no recibió antibióticos (Ctrl), y 3 grupos tratados con antibióticos. Los esquemas de antibióticos analizados fueron: A1) ampicilina (AMP)/amikacina (AMK), A2) tazobactam-piperacilina (TZP)/vancomicina (VAN), A3) combinación de esquemas de antibióticos incluyendo los anteriores, meropenem (MEM) y Claritromicina (CLR). Se extrajo el DNA de las muestras de heces neonatales recuperadas alrededor de los 30 días de vida extrauterina y se cuantificaron bacterias totales, los phylum Firmicutes, Bacteroidetes, y Actinobacteria, y la familia *Enterobacteriaceae* mediante PCR en tiempo real del gen 16S rDNA.

La abundancia relativa de bacterias totales, *Enterobacteriaceae* y Bacteroidetes fue similar entre los neonatos no tratados (Ctrl) y tratados con antibióticos. En contraste, los neonatos tratados con la combinación de antibióticos TZP/VAN (A2) mostró una menor cantidad de Actinobacteria en comparación con el grupo control ($p=0.017$), y con respecto al grupo de neonatos tratados con el esquema AMP/AMK (A1) ($p=0.024$). En cuanto a Firmicutes, encontramos que los bebés que recibieron esquemas de TZP/VAN (A2), tendieron a presentar una mayor cantidad de estas bacterias con respecto al resto de los grupos de estudio. En cuanto a la proporción Firmicutes/Bacteroidetes, esta fue de 1 para el grupo control y los grupos tratados con AMP/AMK (A1) o la combinación de antibióticos (A3), mientras que aquellos tratados con el esquema TZP/VAN (A2) tendieron a mostrar una proporción de 1.5, sugiriendo una mayor abundancia de Firmicutes con respecto a Bacteroidetes. Finalmente, en general se observó una mayor abundancia relativa de bacterias totales y *Enterobacteriaceae* en los neonatos prematuros, seguida de Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria.

Es necesario ampliar el análisis incluyendo más individuos de estudio, y valorar días previos y posteriores a los 30 días de vida. Además, es importante considerar el uso de antibióticos prenatales, y realizar el análisis a nivel género y especie de bacterias comensales y patógenas para determinar si el uso de antibióticos en la etapa neonatal es un factor importante en la aparición de disbiosis intestinal.

2. Introducción

El ser humano vive en relación simbiótica con trillones de microorganismos que lo habitan en comunidades complejas y evolucionadas. Sitios como la piel, la cavidad oral, genitales, vías respiratorias e intestino, están colonizadas de forma normal en su mayoría por bacterias, y en menor cantidad por virus, arqueas y microorganismos eucariotas. Este conjunto de microorganismos tiene un importante papel en el desarrollo, fisiología, inmunidad e incluso nutrición del hospedero, y es denominado *microbiota*. Por su parte, la microbiota intestinal (MI) es una de las más estudiadas en la actualidad y se sabe que juega un papel importante en el mantenimiento de la salud del ser humano (Koleva, Kim, Scott, & Kozyrskyj, 2015; Kuperman & Koren, 2016; Maranduba et al., 2015; Wopereis, Oozeer, Knipping, Belzer, & Knol, 2014).

Se piensa que la colonización de la MI comienza antes del parto y continúa después del nacimiento hasta los 2 o 3 años cuando se vuelve estable y semeja la del adulto. Esta colonización se ve influenciada por diversos factores como: el tipo de nacimiento (vaginal o por cesárea), el tipo de alimentación (leche humana o fórmula), medidas de higiene, edad gestacional y el uso de antibióticos. Los últimos dos factores están estrechamente relacionados con el desequilibrio de la microbiota ya que los neonatos prematuros están predispuestos a recibir tratamiento con antibióticos al presentar una mayor susceptibilidad a infecciones debido a la inmadurez de su sistema inmunológico (SI) (Tanaka & Nakayama, 2017).

Diversos estudios señalan que una microbiota perturbada a temprana edad puede resultar en consecuencias negativas para el hospedero a corto y largo plazo al alterarse funciones del organismo como: la maduración del intestino, angiogénesis, maduración y regulación del SI, digestión de nutrientes y protección contra microorganismos patógenos. A pesar de los avances en la caracterización de la microbiota humana aún falta mucho por comprender. Por ejemplo, es necesario conocer con mayor profundidad cómo se establece la MI infantil, cómo varía su composición y maduración según la edad gestacional al nacimiento y

cómo influye la administración de antibióticos en la MI en neonatos pretérmino. Conocer estas incógnitas es esencial para comprender mejor la dinámica de la colonización bacteriana del tracto gastrointestinal (GI) en la infancia e identificar estrategias que permitan incrementar el establecimiento de bacterias benéficas y disminuir la colonización por bacterias patógenas causantes de enfermedad (Collado, Cernada, Bäuerl, Vento, & Pérez-Martínez, 2012; Kuppala, Meinzen-Derr, Morrow, & Schibler, 2011).

3. Marco Teórico

3.1 Microbiota humana

El cuerpo humano es habitado por complejas comunidades de microorganismos. El término *microbiota* se refiere a la comunidad microbiana viva que coloniza algún nicho ecológico determinado (Icaza-Chávez, 2013). En los últimos 4 millones de años, la evolución de los homínidos se ha dado a la par con sus *microbiomas* (composición genética o suma de los genomas de la microbiota) (Aagaard et al., 2014). Se calcula que la microbiota humana está conformada por 10^{14} microorganismos, superando el número de células humanas en un factor de 10 (Simreñ et al., 2013), e incluye alrededor de 500 a 1000 especies (Neu et al., 2015). La microbiota se clasifica taxonómicamente a través de la nomenclatura biológica tradicional: dominio, reino, división/phylum, clase, orden, familia, género y especie.

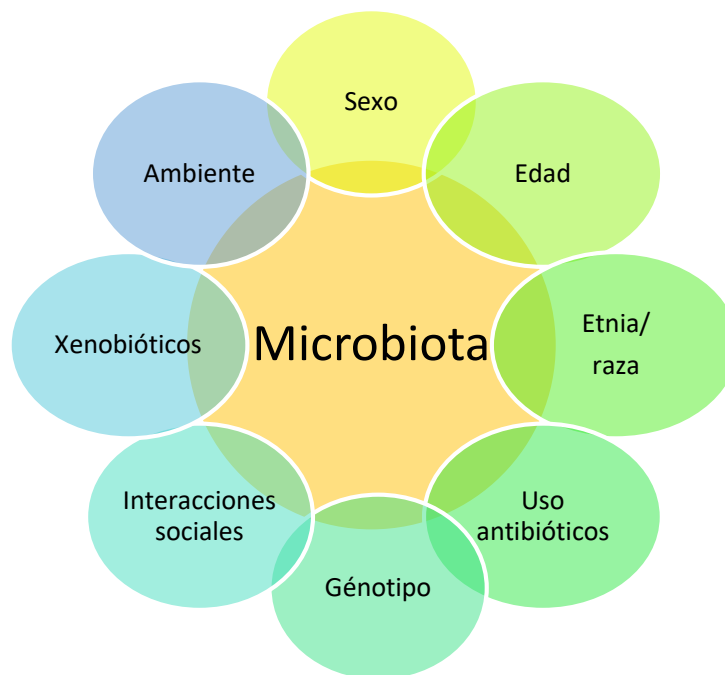


Figura 1 Factores que influyen en la composición de la microbiota de un individuo.

3.2 Barrera intestinal

El intestino humano, principalmente el intestino grueso (colon) alberga un ecosistema de millares de microorganismos. Tiene aproximadamente 300 m² de superficie por lo que es una de las regiones del cuerpo que reciben la mayor

cantidad antigénica, por ello, además de sus funciones de nutrición funge como defensa ante sustancia dañinas y microorganismos patógenos.

La barrera intestinal se encarga de mantener la homeostasis, por un lado, evita el paso de sustancias nocivas, microorganismos patógenos, factores proinflamatorios y antígenos, y por el otro permite la colonización de bacterias comensales que son parte fundamental en la digestión de alimentos, del desarrollo del SI, intestinal y de los circuitos neuronales intestino-cerebro, entre otras funciones (Guarner, 2007; Salvo, Alonso, Pardo, Casado, & Vicario, 2015).

Está compuesta por tres capas, la primera formada por moco, agua y glicocáliz con propiedades hidrófobas y tensoactivas, esta capa contiene Inmunoglobulina A secretora (SIgA) y péptidos antimicrobianos (AMPs). A su vez se divide en dos subcapas siendo la subcapa externa (menos densa) la que se encuentra altamente colonizada por la microbiota. La segunda está formada por una monocapa de células epiteliales intestinales (CEI), mientras que la tercera está constituida por la lámina propia y el mesenterio (Maranduba et al., 2015; Salvo et al., 2015).

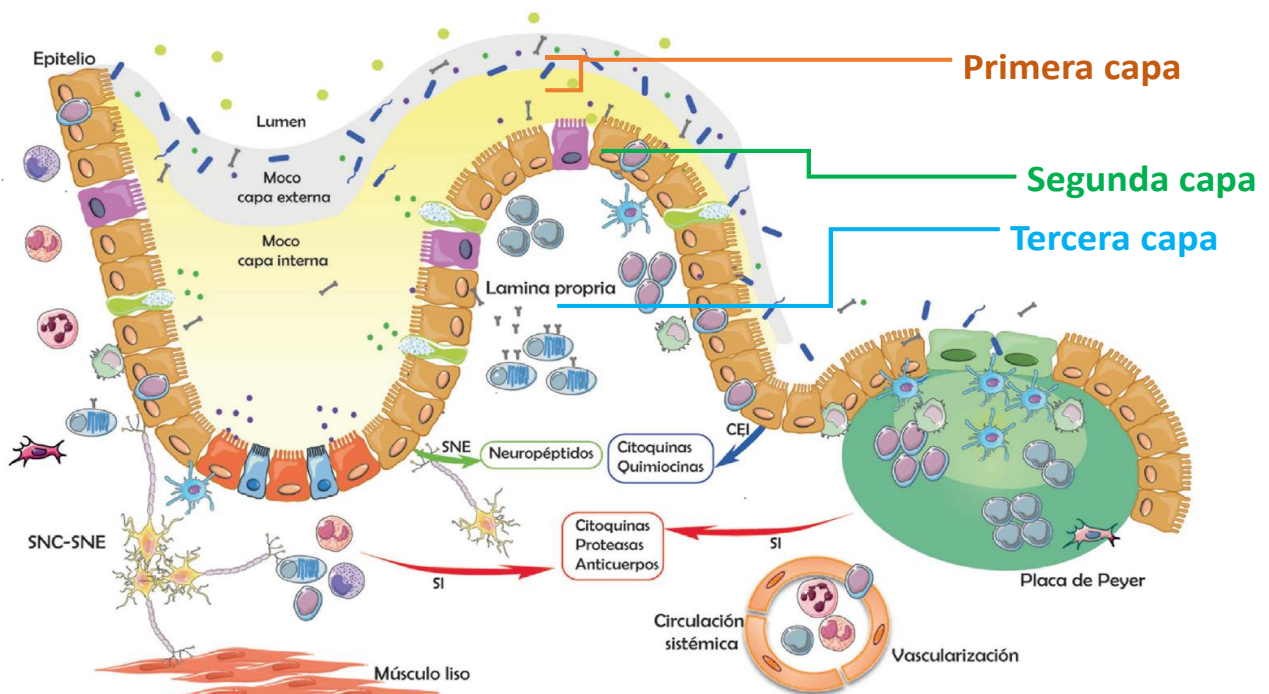


Figura 2 Anatomía de las tres capas que conforman la barrera intestinal (Modificada de: Salvo et. al., 2015).

3.3 Composición de la MI

La microbiota del tracto GI normal está formada en su mayoría por bacterias anaerobias, superando en 100 a 1000 veces a las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (Yatsunenکو et al., 2012), con un contenido de 10^1 a 10^3 bacterias por gramo en el estómago y duodeno, y de 10^{11} - 10^{12} en el colon. Existen más de 50 phylum bacterianos en la tierra, pero la microbiota del cuerpo humano (incluyendo la MI) está dominada solamente por cuatro: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria. La MI es de las más abundantes representada por una gran diversidad de géneros pertenecientes a los cuatro phylum mencionados (Dethlefsen, McFall-Ngai, & Relman, 2007; O'Hara & Shanahan, 2006).

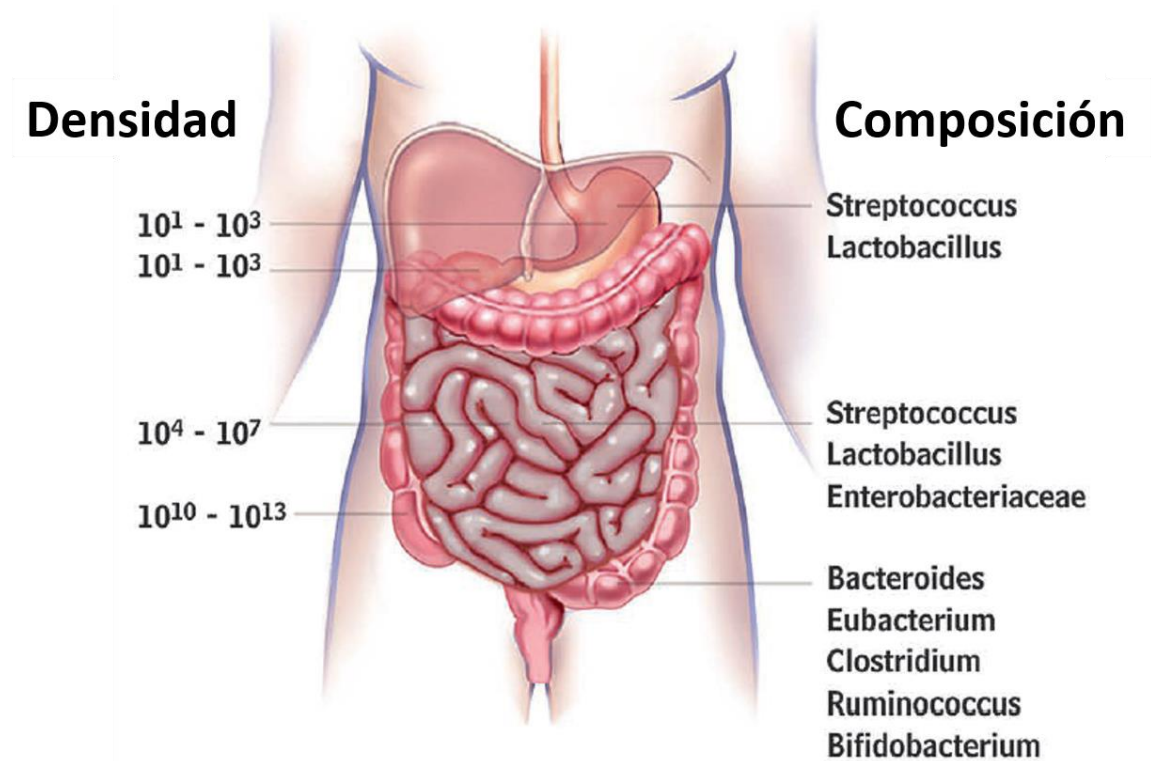


Figura 3 Densidad y composición de la microbiota del tracto GI (Modificada de: Simreñ et al. 2013).

3.4 Funciones de la MI

La MI realiza diversas funciones benéficas para el hospedero a cambio de un sitio con temperatura y nutrientes adecuados para establecer sus ecosistemas. Esta relación simbiótica facilita la absorción de nutrientes adquiridos por la alimentación y proporciona algunos nutrientes no esenciales (vitaminas), previene la invasión o

crecimiento exagerado de agentes patógenos, tiene funciones tróficas en el epitelio GI, y es parte del desarrollo y regulación del SI (Guarner, 2007; Maynard, Elson, Hatton, & Weaver, 2012).

Las bacterias tienen la capacidad de metabolizar algunos compuestos para los cuales el humano no tiene las enzimas necesarias. Dentro de sus funciones metabólicas se encuentran:

- 1) La síntesis de aminoácidos
- 2) La producción de vitaminas: K, B₁₂, biotina, ácido fólico y pantoténico
- 3) La síntesis de ácidos grasos de cadena corta (SCFA)
- 4) Participación en vías metabólicas como: trimetilamina (TMA)/trimetilamina N-óxido (TMAO), las vías primarias y secundarias del ácido biliar
- 5) La interacción con hormonas endocrinas, como la grelina, la leptina, el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y el péptido YY (PYY) (Guarner, 2007; Tang et al., 2018).

La MI regula la barrera mucosa del intestino controlando la absorción y metabolismo de nutrientes, por ejemplo, interviniendo en la homeostasis de la glucosa por la estimulación del sistema nervioso parasimpático, así como la maduración de la propia mucosa y el tejido linfoide asociado con el intestino (GALT por sus siglas en inglés) (Maynard et al., 2012; Tang et al., 2018).

También es capaz de comunicarse con tejidos distales, el lipopolisacárido (LPS) y peptidoglicano son componentes de la membrana bacteriana que funcionan como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales interactúan con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) expresados por las células de la mucosa intestinal (Tang et al., 2018).

Estudios recientes hablan de la conexión entre la microbiota y sus metabolitos con el cerebro, a través del nervio vago y el sistema parasimpático. Además, la MI evita el alojamiento de microorganismos patógenos al limitar los elementos nutricionales y el espacio disponible de cada nicho (Maynard et al., 2012).

3.5 Colonización de la MI

3.5.1 Antes del nacimiento

En la actualidad hay un debate acerca del inicio de la colonización de la MI en el humano. Algunos estudios apoyan una colonización intrauterina por el hallazgo de bacterias o sus productos en líquido amniótico (LA) (Collado, Rautava, Aakko, Isolauri, & Salminen, 2016), cordón umbilical, membranas fetales, placenta (Aagaard et al., 2014) e incluso en el meconio. Mientras que otros señalan un ambiente estéril apoyando el dogma central de la esterilidad del ambiente uterino.

Se ha propuesto que algunos cambios fisiológicos y hormonales que ocurren en el embarazo pueden explicar la presencia de bacterias en sitios que se creían estériles. Por ejemplo, la translocación bacteriana desde la cavidad oral o vaginal por torrente sanguíneo favorecida por un aumento en la permeabilidad, la diseminación hematogena o la migración del tracto GI inferior o tracto genitourinario (Figura 4) (Kuperman & Koren, 2016; Madianos, Bobetsis, & Offenbacher, 2013).

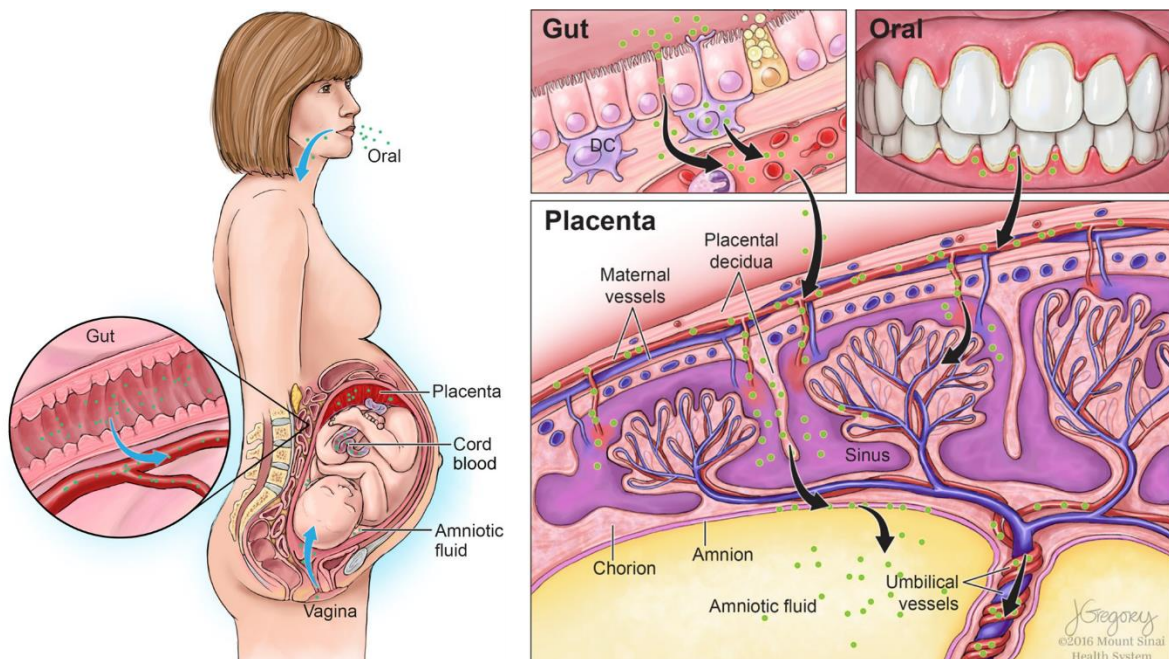


Figura 4 Translocación bacteriana de la cavidad oral, intestino y vagina de la madre a ubicaciones intrauterinas (Modificada de: Walker, Clemente, Peter, & Loos, 2017).

Por ejemplo, Aagaard y colaboradores (2014) descubrieron gran similitud entre bacterias encontradas en placenta y en la cavidad oral materna, además, se piensa que el LA puede ser el primer contacto con bacterias al ser ingerido en la etapa fetal. Por otra parte, diversos estudios han mostrado que la composición bacteriana del meconio es muy semejante a la del LA (61 %), y en menor cantidad con la cavidad oral y vaginal de las mujeres embarazadas, proponiendo que el meconio es el reflejo del entorno dentro del útero (Ardissone et al., 2014). Los principales phylum que han sido encontrados en el meconio son Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria (Hu et al., 2013), y las especies *E. faecalis*, *S. epidermidis*, y *E. coli* (Jiménez et al., 2008).

Finalmente, entre los estudios a favor del ambiente uterino estéril se encuentra el trabajo de Malmuthuge y Griebel (2018), quienes, en un modelo ovino, evaluaron el ambiente intrauterino e intestinal de los fetos, y concluyeron que hasta el tercer trimestre del embarazo hay un ambiente estéril. Por otro lado, Domínguez Bello señala que en el nacimiento la esterilidad se pierde cuando se rompe el saco amniótico exponiendo a los bebés a ingerir bacterias que ingresan al intestino antes de realizar su primera evacuación lo que explicaría la presencia de bacterias en el meconio (Willyard, 2018).

3.5.2 Después del nacimiento

A pesar de que algunos estudios recientes señalan que la colonización microbiana comienza antes del nacimiento, el establecimiento más significativo de la microbiota ocurre tras dos importantes eventos: el primero es el nacimiento y la lactancia, y el segundo la introducción de alimentos sólidos (Tanaka & Nakayama, 2017). Esto es parte de la teoría de la “programación temprana”, donde tales eventos producirán diversos cambios fisiológicos permanentes. En la primera semana de vida extrauterina hay variaciones dinámicas en la composición de la microbiota (Aagaard et al., 2014), posteriormente continúa diversificándose hasta los 2 o 3 años.

La colonización inicial ocurre principalmente por anaerobios facultativos como *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterobacteriaceae*. Posteriormente, presiones

ambientales selectivas como los oligosacáridos de la leche humana (HMO por sus siglas en inglés) y el consumo de oxígeno, ocasionan un cambio donde se da paso a los colonizadores tardíos conformados por anaerobios estrictos como *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Clostridium* (Monica et al., 2018; Simreñ et al., 2013). *Bifidobacterium* es dominante en la microbiota hasta la introducción de alimentos sólidos, y después del destete es reemplazada por *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Clostridium* y *Veillonella* (Tanaka & Nakayama, 2017). La colonización microbiana está influenciada por distintos factores como:

- Parto prematuro o a término
- Tipo de nacimiento
- Tipo de alimentación
- Medidas higiénicas
- Administración de antibióticos
- Factores genéticos

3.5.2.1 Parto prematuro

Diversos estudios coinciden en que la edad de nacimiento es un factor que interviene en la colonización de la MI, reportando diferencias entre la colonización de bebés prematuros y a término.

Un bebé a término es aquel nacido vivo entre las 37 y 40 semanas de gestación (SDG), mientras que un prematuro es el que nace antes de cumplir las 37 SDG. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que cada año nacen aproximadamente 15 millones de neonatos prematuros y los clasifica en 3 categorías:

- 1) Prematuros extremos (<28 SDG)
- 2) Muy prematuros (28 a 32 SDG)
- 3) Prematuros moderados a tardíos (32 a 37 SDG)

La prematuridad es un problema de salud pública que implica una alta morbilidad y mortalidad neonatal, y entre las causas del parto prematuro se encuentran: embarazos múltiples, infecciones y enfermedades crónicas, tabaquismo materno y

factores genéticos (WHO, 2018). El 25 % de partos prematuros se atribuyen a causas infecciosas evidenciadas por presencia de bacterias en placenta y LA. Estas bacterias propician la liberación de citocinas proinflamatorias, prostaglandinas y metaloproteasas, que conducen a la maduración cervical, ruptura de membranas, contracciones uterinas y parto prematuro. La cantidad de marcadores de inflamación y Ácido Desoxirribonucleico (DNA) bacteriano se correlaciona inversamente con la edad gestacional (Ardissone et al., 2014).

Se ha planteado que la colonización intestinal en los bebés prematuros se ve afectada, presentando una microbiota menos estable y diversa con aumento de bacterias patógenas con respecto a los bebés a término. Se ha reportado que en bebés prematuros el phylum más abundante es Proteobacteria, representando un 54.3 % aproximadamente, y que muestran una disminución en *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* en comparación con los bebés a término, estas últimas relacionadas con el funcionamiento metabólico y el entrenamiento inmunológico (Chernikova et al., 2018; Cong et al., 2016; Wandro et al., 2018).

3.5.2.2 Tipo de nacimiento

Se ha reportado que la MI de los bebés nacidos por canal vaginal es más abundante y diversa a la de aquellos nacidos por cesárea, y que en los primeros 90 días de vida la diversidad dentro de los phylum Actinobacteria y Bacteroidetes es menor en los bebés nacidos por cesárea (Collado et al., 2012; Rutayisire, Huang, Liu, & Tao, 2016). Los bebés nacidos por canal vaginal exhiben abundantes *Lactobacillus*, *Prevotella* y *Sneathia*, adquiridos al entrar en contacto con la microbiota vaginal y fecal materna, mientras que los nacidos por cesárea presentan una mayor densidad de *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*, que provienen de la cavidad oral y la piel materna (Dominguez-Bello et al., 2010). Esta transmisión de la microbiota de la madre al hijo tendrá un impacto en la salud del bebé a corto y largo plazo.

3.5.2.3 Tipo de alimentación

Los lactantes alimentados con leche materna muestran gran diferencia en su microbiota comparados con los bebés alimentados con fórmula. La leche materna contiene bacterias presentes en el pezón, los conductos galactóforos y la piel como *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, además de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, y éstas últimas pueden alcanzar hasta el 60-90 % del total de bacterias en las heces. También contiene compuestos como aminoácidos, minerales, vitaminas, inmunoglobulinas, endocannabinoides y HMO, como los galactooligosacáridos (GOS), los cuales tienen diversas funciones esenciales para los neonatos y la microbiota. La lactancia materna tiene resultados positivos en el neonato ya que ayuda a la estimulación y maduración del SI. Neonatos prematuros alimentados con leche humana presentan menor probabilidad de desarrollar enterocolitis necrosante (ECN) y sepsis tardía, un mejor crecimiento y una mejor modulación del metabolismo y condiciones inflamatorias (Collado et al., 2012; Monica et al., 2018; Tanaka & Nakayama, 2017).

La alimentación con fórmula propicia una MI similar a la de los adultos, con un número dominante de anaerobios facultativos como *Bacteroides* y *Clostridium*, con una colonización tardía por *Bifidobacterium*. Además, se observa un incremento en los géneros *Rothia*, *Streptococcus*, *Acidaminococcus*, *Escherichia coli* y *Clostridium difficile* (Collado et al., 2012; Parra-Llorca et al., 2018).

Otro tipo de alimentación es la leche humana pasteurizada que no sustituye a la lactancia materna debido a que el método de pasteurización ocasiona la pérdida de componentes estructurales y funcionales de la leche, por ejemplo, disminuye los componentes celulares y bacterianos, la actividad de la lactoferrina, lisozima y el contenido de inmunoglobulina A (IgA), aunque mantiene otros componentes como algunos oligosacáridos, nucleótidos y ácidos grasos poliinsaturados y de cadena larga (Parra-Llorca et al., 2018).

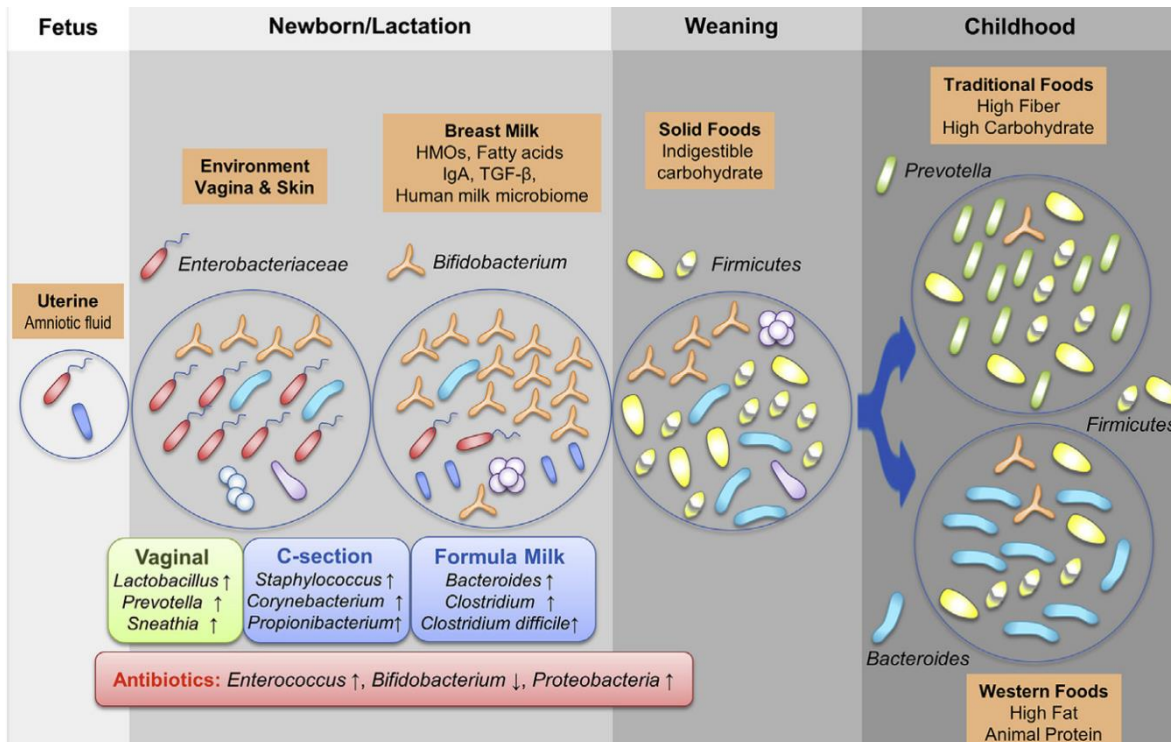


Figura 5 Factores que intervienen en la colonización de la MI (Tanaka & Nakayama, 2017).

3.5.2.4 Prematurez, uso de antibióticos y origen de enfermedades

Los bebés prematuros tienen un SI y un tracto intestinal inmaduro lo que incrementa su susceptibilidad a enfermedades infecciosas requiriendo del uso de antibióticos (Chernikova et al., 2018). Por ejemplo, la translocación bacteriana del intestino al torrente sanguíneo se ve favorecida con una función de barrera disminuida y aumento de permeabilidad, provocando problemas de salud comunes en este sector como la sepsis (Madianos et al., 2013).

El uso de antibióticos como profilaxis o frente al diagnóstico salva vidas, sin embargo, la exposición de los bebés a los antibióticos puede alterar las interacciones normales entre el hospedero y su microbiota, provocando un desequilibrio en las proporciones bacterianas con una pérdida de la diversidad, lo que se conoce como *disbiosis* (Rautava, Luoto, Salminen, & Isolauri, 2012).

Los antibióticos orales e inyectables se distribuyen por la sangre y afectan no sólo a las bacterias patógenas sino también a bacterias comensales (Stoll et al., 2002). El uso de antibióticos en la edad temprana tiene efectos adversos en el desarrollo

de la MI, por ejemplo, se ha reportado una mayor abundancia del phylum Proteobacteria y baja abundancia de Actinobacteria, menor diversidad en la microbiota y presencia de bacterias resistentes a antibióticos (Arboleya et al., 2016).

Diversos estudios epidemiológicos en humanos plantean que el uso de antibióticos en etapas tempranas de la infancia altera la MI e incrementa el riesgo de desarrollar diversas enfermedades a corto y largo plazo. Por ejemplo, se ha relacionado el uso de antibióticos en neonatos con enfermedades como la ECN y la sepsis tardía (Alexander, Northrup, & Bizzarro, 2011; Cotten et al., 2009; Kuppala et al., 2011). Otros estudios señalan la relación del uso de antibióticos en la infancia con enfermedades como el asma (Arrieta et al., 2015; Hoskin-Parr, Teyhan, Blocker, & Henderson, 2013), la obesidad (Azad, Bridgman, Becker, & Kozyrskyj, 2014) y la enfermedad de Crohn (Virta, Auvinen, Helenius, Huovinen, & Kolho, 2012).

3.6 Administración de antibióticos neonatales en el INPer-IER

La decisión del uso de antibióticos se basa en diversos criterios como:

- a) Antecedentes maternos de infección antes o durante el nacimiento (riesgo de sepsis neonatal)
- b) Sospecha o diagnóstico de: sepsis neonatal temprana (durante las primeras 72 horas de vida extrauterina), sepsis neonatal tardía (posterior a las 72 horas de vida extrauterina), ECN, choque séptico, neumonía
- c) Cultivos positivos de secreciones neonatales

En la Tabla 1 se describen los esquemas antibióticos empleados de acuerdo con el diagnóstico clínico neonatal en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) y la Unidad de Cuidados Intermedios al Recién Nacido (UCIREN) del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer-IER).

Tabla 1 Esquemas de antibióticos neonatales usados en el INPer-IER	
Diagnóstico clínico	Esquema antibiótico
Sepsis temprana	Ampicilina + Amikacina
Sepsis tardía	Tazobactam-Piperacilina + Vancomicina
Sepsis de evolución tórpida, choque séptico, enterocolitis necrosante	Tazobactam-Piperacilina + Vancomicina Meropenem
Neumonía por gérmenes atípicos	Claritromicina

Los antibióticos mencionados tienen como principal mecanismo de acción la alteración de la síntesis proteica y de la pared bacteriana, y su espectro afecta no solo los microorganismos patógenos. Los antibióticos son indispensables para el tratamiento de infecciones bacterianas, sin embargo, su uso desmedido e inadecuado puede llevar a problemas de salud importantes, no solo por la generación de bacterias multidrogo-resistentes (MDR) sino por la disbiosis que pueden provocar al eliminar o reducir el número de bacterias benéficas que son parte de la MI.

3.6.1 Características de los antibióticos neonatales usados en el INPer-IER

La **ampicilina** es un antibiótico β -lactámico que inhibe la síntesis de la pared celular e induce la activación de enzimas autocatalíticas que provocan lisis de la célula bacteriana. Su espectro son las bacterias Gram negativas (como *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) y está implicada en la reducción en general de la diversidad de la MI (Langdon, Crook, & Dantas, 2016; Pedro, Alfonso, Juan, María, & Antonio, 2009). Por su parte, la **amikacina** es activa contra especies Gram negativas como *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Providencia sp*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia sp*, *Acinetobacter sp* y *Citrobacter freundii*. Su espectro en Gram positivos es reducido, sin embargo, es activa frente a especies de *Staphylococcus* (UNAM, 2007).

La **piperacilina** es un antimicrobiano β -lactámico de amplio espectro que aumenta en combinación con el **tazobactam**, el cual funge como un inhibidor de la β -lactamasa, fijándose de forma irreversible al sustrato de la enzima. Su espectro incluye Gram positivos como *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *S. aureus*,

Streptococcus y *Enterococcus*, y Gram negativos como Bacteroidetes (*Prevotella*). Por su parte, **vancomicina** es un antibiótico glucopéptido bactericida con un espectro Gram positivo, su acción radica en la unión a los aminoácidos terminales de las cadenas laterales del peptidoglicano inhibiendo su ensamblaje lineal (Avery, Mary, & Mhairi, 2001; Basilio, Maser, & Morente, 2004; Sullivan, Edlund, & Nord, 2002).

Meropenem es un antibiótico carbapenémico, su espectro es el más amplio de todos los antibióticos β -lactámicos, penetra fácilmente las bacterias Gram negativas y Gram positivas y tiene un alto nivel de resistencia a las β -lactamasas.

Claritromicina es un macrólido semisintético utilizado en infecciones atípicas, tiene acción prolongada y es resistente a las β -lactamasas. Su espectro incluye *B. catarrhalis*, *H. influenzae* y *S. aureus* resistente a las penicilinas, ampicilinas y cefalosporinas, *Chlamydia* y *Mycoplasma*.

3.7 Caracterización de la microbiota

En los últimos años, el estudio de la microbiota y su importancia en la salud humana ha cobrado relevancia. Las técnicas moleculares como la secuenciación del gen 16S DNA ribosomal (rDNA), la secuenciación de genoma completo y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han permitido caracterizar la diversidad bacteriana presente en diferentes nichos del cuerpo humano, sustituyendo las técnicas convencionales de cultivo bacteriano que pueden ser ineficaces por la dificultad e incluso imposibilidad de cultivar, aislar e identificar muchas bacterias.

3.7.1 Características del gen 16S rDNA

El gen 16S rDNA es una secuencia de nucleótidos de doble cadena que está presente en la mayoría de las bacterias y codifica al 16S RNA ribosomal (rRNA) presente en los ribosomas bacterianos. El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (Svedberg), que a su vez se disocia en la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S). La subunidad 30S contiene el 16S rRNA y 21 proteínas diferentes (S1-S21).

La secuencia de este gen varía entre microorganismos lo que ha permitido la identificación molecular de las bacterias. Es muy utilizada en el diagnóstico y secuenciación del material genético de bacterias importantes para la salud humana, además de que su uso ha ayudado al estudio de la filogenia y taxonomía bacteriana (Janda & Abbott, 2007; María del Rosario Rodicio y María del Carmen, 2004; Rin, 2011).

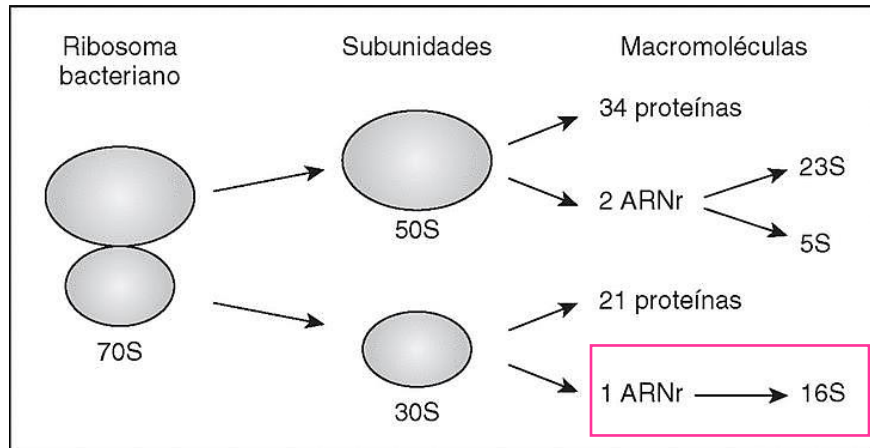


Figura 6 Subunidades y macromoléculas que conforman el ribosoma bacteriano. Se observa el 16S rRNA (cuadro rosa) parte de la subunidad pequeña que proviene del gen 16S rDNA (Modificada de Rodicio, M., Mendoza, M. 2004).

3.7.2 Reacción de Cadena Polimerasa (PCR)

La técnica de PCR adapta condiciones *in vitro* del proceso de replicación del DNA. Permite multiplicar (amplificar) cantidades pequeñas de DNA millones de veces y consiste básicamente en tres pasos:

- 1) *Desnaturalización*: Separación de las cadenas de DNA por medio de calor
- 2) *Alineamiento*: Los oligonucleótidos se unen al DNA diana (templado)
- 3) *Extensión*: Es la síntesis de nuevas cadenas por la enzima DNA polimerasa

Estos 3 pasos se repiten en secuencia, cada repetición es un ciclo y cada PCR requiere entre 25 a 40 ciclos de amplificación.

Los componentes de la reacción son:

- Oligonucleótidos (encargados de flanquear el DNA a amplificar)
- DNA polimerasa y magnesio como su cofactor
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)
- Buffer de reacción
- DNA diana (Panduro, 2000).

3.7.3 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR), es una modificación de la técnica convencional, en la que se determina la cantidad de DNA que se amplifica conforme se produce la reacción, es decir, se detectan los productos amplificados (amplicones) durante cada ciclo. Esto se realiza al medir la señal de fluorescencia que aumenta con cada ciclo y que es directamente proporcional a la cantidad de DNA presente. Esta técnica ha sido empleada para caracterizar la composición de la microbiota, mediante el uso de oligonucleótidos específicos para los principales phylum, géneros y especies bacterianas en muestras animales y humanas (Yang et al., 2015).

La técnica de PCR es llevada a cabo en equipos llamados *termocicladores*, los cuales se encargan de hacer transiciones de temperaturas para las etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión del DNA, y en el caso de la qPCR el equipo tiene incorporado un fluorómetro que detecta y monitorea las señales fluorescentes (Figura 7 A y B) (Aguilera et al., 2015). Debido a su costo y facilidad de estandarización, uno de los fluoróforos más usados es el agente intercalante *SYBR Green*. Este compuesto orgánico que pertenece al grupo de las cianinas asimétricas tiene la propiedad de unirse al surco menor del DNA de doble cadena y emitir una señal de fluorescencia 1000 veces mayor a la mostrada en su estado libre, por lo que la fluorescencia medida es directamente proporcional a la cantidad de DNA en la reacción.

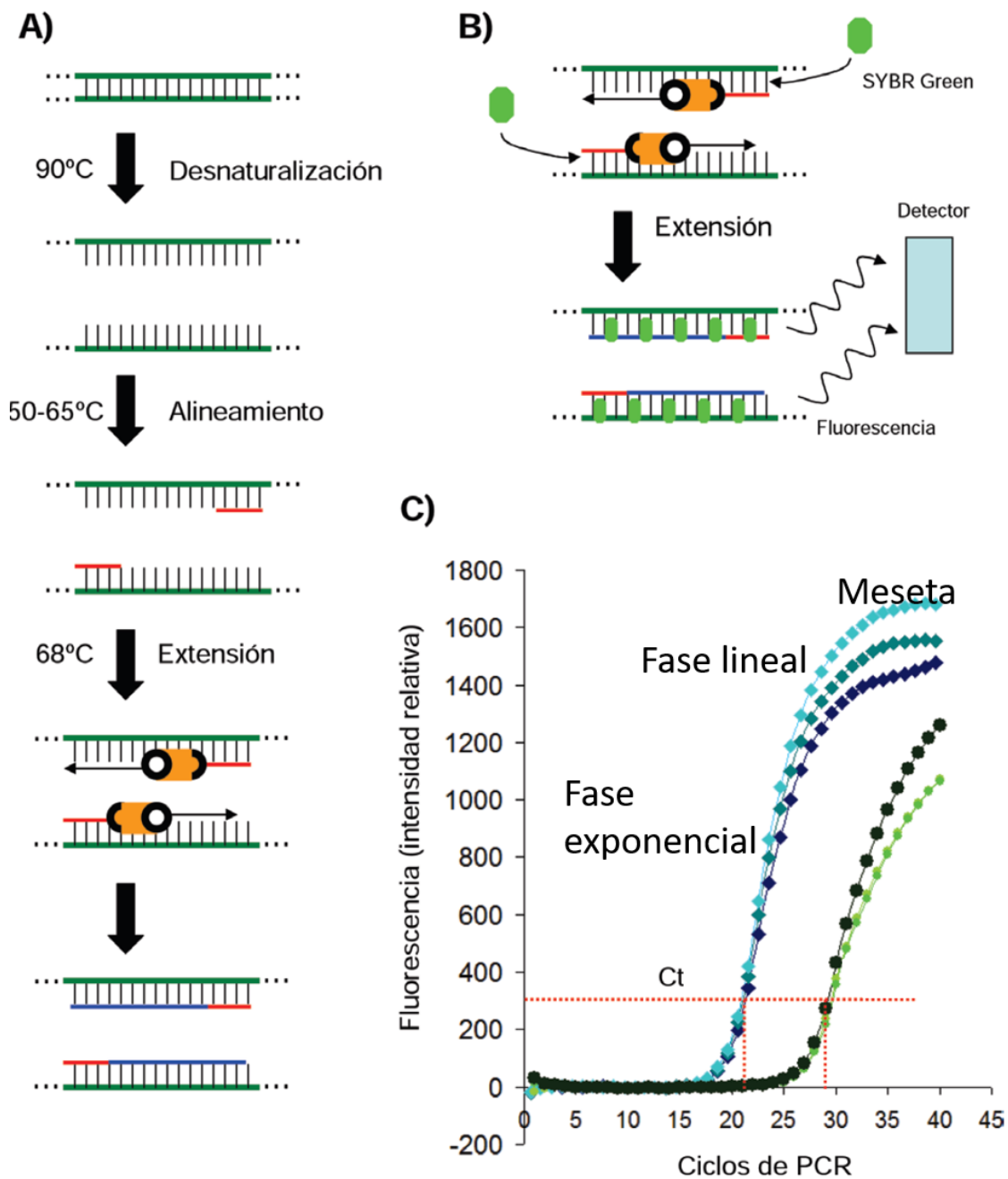


Figura 7 PCR en tiempo real. A) Etapas de la qPCR: desnaturalización, alineamiento y extensión. Verde: Cadena original, Rojo: Oligonucleótidos, Naranja: DNA polimerasa, Azul: Nuevas cadenas sintetizadas. B) SYBR Green intercalado en DNA doble cadena. C) Fase exponencial, lineal y meseta de la reacción y ciclo umbral (Ct) mostrando la amplificación de 2 diferentes muestras de DNA (Modificada de: Peña-Castro, 2013).

Para determinar la concentración de DNA blanco presente en la muestra se calcula la señal de fondo (ruido), el ciclo umbral (Ct por sus siglas en inglés: cycle threshold) y la eficiencia de la reacción. Las fases de la reacción son: inicial, logarítmica o exponencial, lineal, y estacionaria o meseta (Figura 7C). En la fase inicial (primeros 10-15 ciclos) no existe la fluorescencia necesaria para diferenciar del ruido. Enseguida, la fase logarítmica presenta una eficiencia casi total debido a que los reactivos de la reacción no se han agotado, mientras que en la fase lineal los reactivos comienzan a ser limitantes y finalmente en la fase estacionaria la reacción se detiene al agotarse los reactivos (Aguilera et al., 2015).

La cuantificación consiste en la utilización de estándares de concentraciones conocidas que generan una relación de forma lineal con el Ct permitiendo determinar la concentración desconocida de las muestras. El Ct corresponde al ciclo de amplificación en el que la fluorescencia del fluorocromo reportero supera el umbral elegido y permite calcular la cantidad inicial de moléculas de DNA por su relación proporcional a la cantidad de DNA blanco, donde a mayor cantidad de DNA en la muestra el valor de Ct será menor.

Para monitorear la formación de los amplicones de interés y descartar la formación de dímeros de oligonucleótidos, es necesario analizar la curva de disociación de la reacción (Figura 8). Esta se obtiene mediante la medición de la fluorescencia en función de la temperatura, a medida que la temperatura aumenta el DNA amplificado se desnaturaliza disminuyendo la fluorescencia debido a la separación del fluorocromo SYBR Green con lo que se determina la temperatura de fusión (Tm por sus siglas en inglés) (Lutfalla & Uze, 2006; Mabel & William, 2006; Valasek & Repa, 2005).

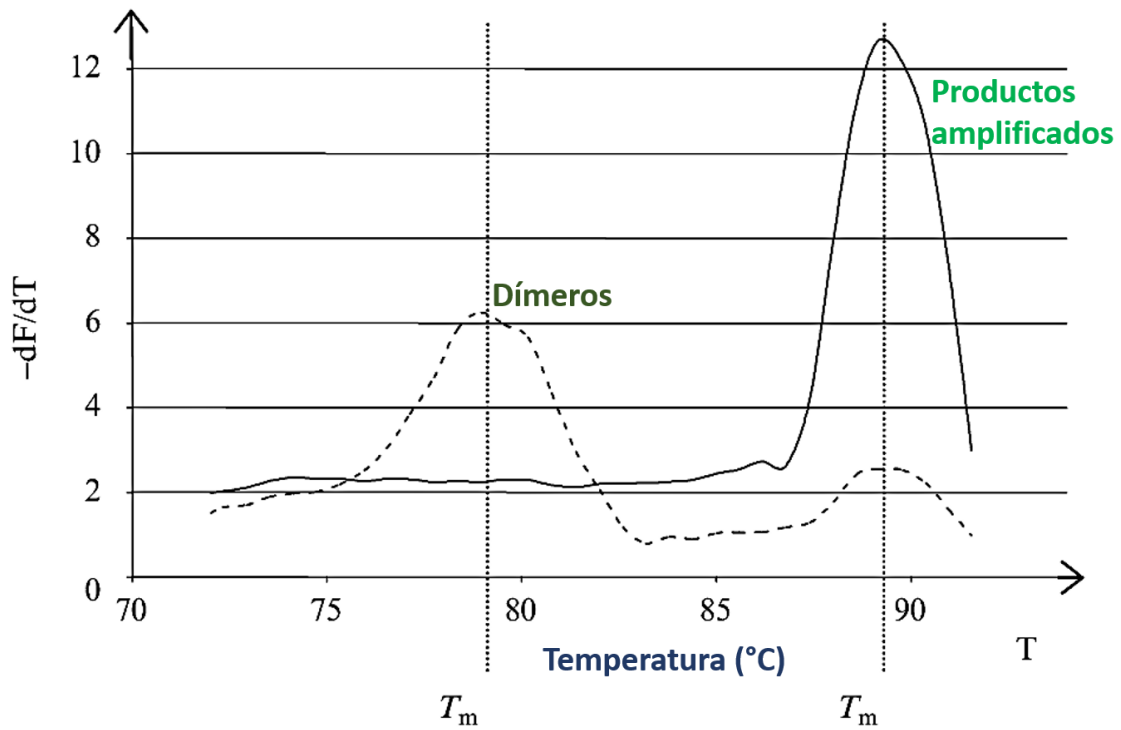


Figura 8 Análisis de la curva de disociación de qPCR. Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica que depende de su longitud y contenido de nucleótidos. La curva de disociación permite diferenciar la fluorescencia correspondiente a la amplificación de un producto de PCR ($T_m > 80\text{ °C}$) de la fluorescencia emitida por dímeros de oligonucleótidos cuya T_m es más baja ($70\text{-}80\text{ °C}$). Las muestras que no amplificaron y los controles negativos no generan picos (Modificada de: Lutfalla & Uze, 2006).

4. Justificación

Cada año nacen aproximadamente 15 millones de neonatos pretérmino a nivel mundial. Debido a su alta susceptibilidad a padecer enfermedades infecciosas los antibióticos son los medicamentos más utilizados en las Unidades de Cuidados Intensivos (WHO, 2018). Las repercusiones en la colonización microbiana intestinal en los neonatos pretérmino que ocasiona el tratamiento con antibióticos a los que frecuentemente se ven expuestos aún no está completamente estudiada (Baranowski & Claud, 2019).

En la actualidad, diversos estudios refieren la importancia de la MI en el desarrollo adecuado del ser humano, encontrando que alteraciones de la microbiota en etapas tempranas de la vida, incrementa el riesgo de sepsis y ECN en neonatos, y de enfermedades autoinmunes, del tracto GI, de sistema nervioso, obesidad y diabetes en la niñez o edad adulta. La sepsis y la ECN son enfermedades con alta morbilidad y mortalidad en neonatos prematuros a nivel mundial, y en nuestro país existe una alta prevalencia de obesidad y diabetes en niños y adultos.

Conocer las repercusiones que tiene el uso de antibióticos en la MI de neonatos pretérmino puede ayudar a concientizar a la comunidad sobre los efectos adversos que pueden ocasionar estos medicamentos, e impulsar la creación de nuevas estrategias de tratamiento, como la inclusión de prebióticos y probióticos diseñados especialmente para este sector, que permitan restablecer la microbiota normal y evitar enfermedades.

5. Objetivo general

Realizar la caracterización inicial de la MI de neonatos prematuros no tratados y tratados con antibióticos durante su estancia hospitalaria mediante la cuantificación de bacterias totales, la familia *Enterobacteriaceae* y los phylum Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria para determinar si existen alteraciones por el tratamiento antibiótico.

5.1 Objetivos particulares

- Formar una cohorte de estudio de neonatos prematuros no tratados y tratados con antibióticos y recolectar muestras de heces durante su estancia hospitalaria.
- Clasificar a los neonatos que recibieron antibióticos en 3 grupos de acuerdo con el tipo de medicamento que recibieron: i) ampicilina y amikacina, ii) tazobactam-piperacilina y vancomicina, iii) combinación de esquemas incluyendo los anteriores más meropenem y/o claritromicina.
- Evaluar los antecedentes infecciosos maternos, datos demográficos y antropométricos, diagnósticos clínicos, tipo de alimentación y resultados de cultivos bacterianos neonatales para determinar si existen diferencias entre los grupos de estudio.
- Analizar el efecto del tratamiento de antibióticos en la MI de neonatos prematuros mediante la cuantificación de bacterias totales, la familia *Enterobacteriaceae* y los phylum Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria en heces obtenidas alrededor del mes de vida extrauterina mediante PCR en tiempo real del gen 16S rDNA.

6. Hipótesis

Si los neonatos prematuros son tratados con antibióticos entonces presentarán alteraciones de la MI al mes de vida extrauterina con respecto a los neonatos que no recibieron estos medicamentos durante su estancia hospitalaria.

7. Diseño experimental

7.1 Tipo de diseño y estudio:

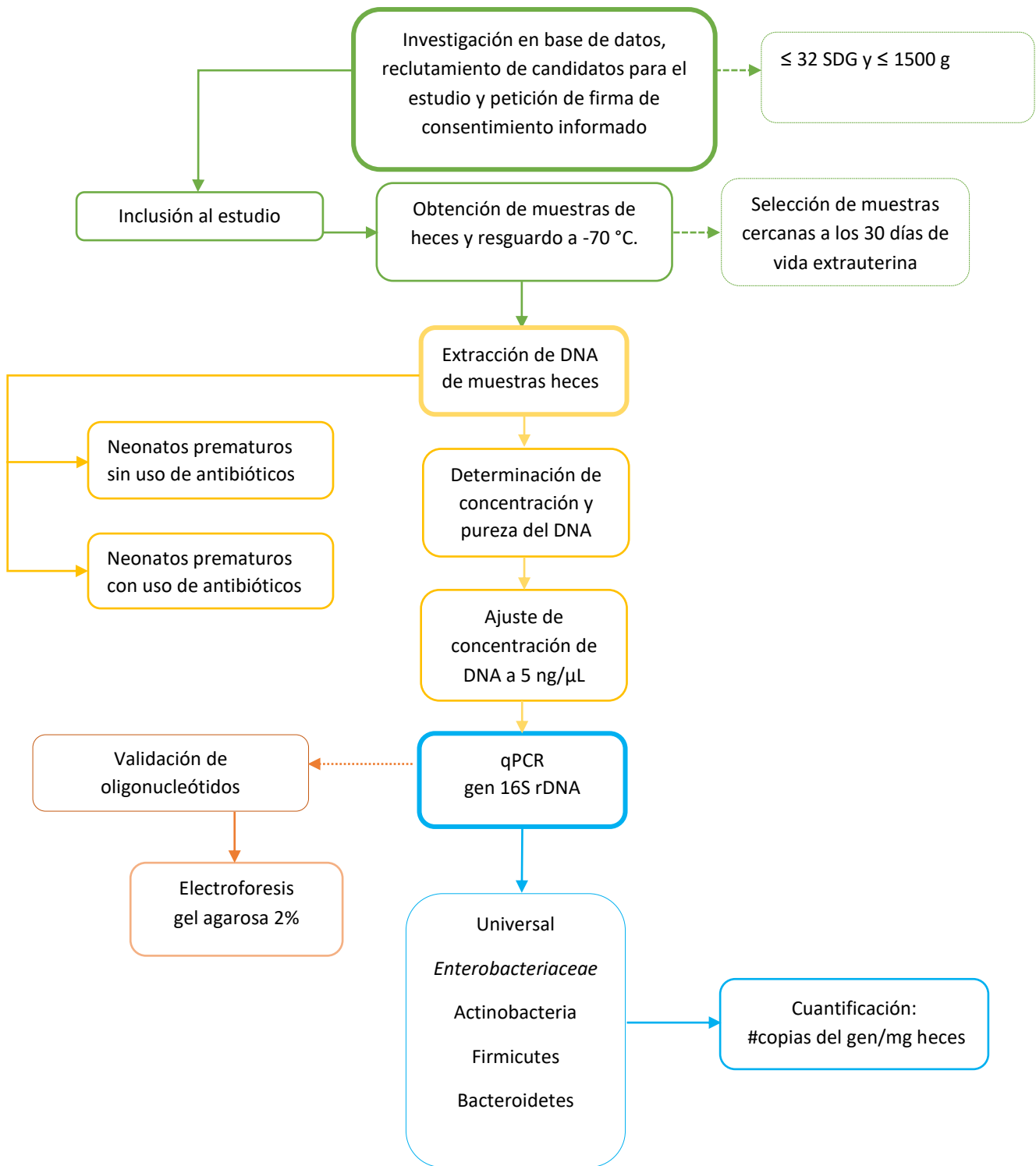
Observacional, cohorte.

7.1.1 Grupos de estudio:

Neonatos prematuros iguales o menores de 32 SDG, hijos de madres mayores de edad, que no presentaron malformaciones, cromosomopatías, enfermedades hematológicas o metabólicas, y que recibieron o no tratamiento con antibióticos durante su estancia hospitalaria en la UCIN o UCIREN del INPer-IER y que sus padres hayan firmado el consentimiento informado.

Se analizó la microbiota intestinal al mes de vida extrauterina de neonatos prematuros que fueron clasificados en 4 grupos de estudio: **i) Control**, no tratados con antibióticos, **ii) Antibiótico 1 (A1)**, tratados con ampicilina (AMP)/amikacina (AMK), **iii) Antibiótico 2 (A2)**, tratados con tazobactam-piperacilina (TZP)/vancomicina (VAN), **iv) Antibiótico 3 (A3)**, tratados con la combinación de esquemas antibióticos incluyendo los anteriores, meropenem (MEM) y claritromicina (CLR).

7.2 Diagrama experimental



8. Materiales

8.1 Reactivos

- QIAamp® PowerFecal® DNA Kit marca Qiagen
- Rotor-Gene® SYBR® Green PCR Kit marca Qiagen
- Oligonucleótidos sintetizados por Integrated DNA Technologies® (IDT)
- H₂O grado biología molecular marca Corning
- Radiant Smart Glow
- Agarosa grado biología molecular marca Thermo Fisher Scientific™
- DNA gel loading dye (6X) marca Thermo Fisher Scientific™
- 100 bp DNA Ladder marca Invitrogen
- Buffer TBE (Tris borato EDTA)

8.2 Equipos

- Termociclador Rotor-Gene® Q marca Qiagen
- NanoDrop 2000/2000 C marca Thermo Scientific™
- Baño seco marca Thermo Scientific®
- Vórtex VTX-5 marca CScientific®
- Transiluminador EpiChemi³ Darkroom
- Sistema de electroforesis Enduro Gel XL marca Labnet International
- Centrifuga mini-spin Eppendorf
- Cabina de flujo laminar Clase II A/B3

9. Metodología

9.1 Recolección y almacenamiento de las muestras de heces

Con la ayuda de la espátula adherida a la tapa de los tubos estériles para heces se recolectaron las muestras directamente del pañal de bebés prematuros cada semana durante su estancia hospitalaria. Las muestras recolectadas fueron inmediatamente refrigeradas a 4°C en la UCIN, transportadas en hieleras con geles refrigerantes al laboratorio, procesadas en condiciones de asepsia, alcuotadas en crioviales de 1.5 mL rotulados con los datos del neonato y la fecha de recolección, y almacenadas a -70 °C hasta su análisis.

9.2 Extracción de DNA de las muestras de heces

Se utilizó el kit QIAamp PowerFecal DNA de Qiagen y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Se descongelaron las muestras de heces en hielo y a continuación se inició el protocolo:

- 1) Se pesaron aproximadamente 200 mg de heces y se colocaron en tubos de 2 mL que contenían perlas de 0.7 mm. Se agregaron 750 µL de la solución PowerBead y 60 µL de la solución C1 (SDS y agentes de disrupción) a cada tubo, se mezcló en vortex brevemente y se calentaron las muestras a 65 °C por 10 minutos en baño seco.
- 2) Enseguida se mezclaron las muestras en vortex a máxima velocidad por 10 minutos, se centrifugaron a 13,000 x g por 1 minuto y se transfirieron los sobrenadantes a tubos de recolección de 2 mL limpios. Se agregaron 250 µL de la solución C2 (elimina inhibidores y precipita material orgánico e inorgánico), se mezcló en vortex brevemente y se incubaron las muestras 5 minutos en hielo.
- 3) Se centrifugaron las muestras a 13,000 x g por 1 minuto y evitando tocar el pellet se recuperaron 600 µL de sobrenadante y se transfirieron a tubos de recolección de 2 mL limpios y se agregaron 200 µL de la solución C3 (elimina inhibidores y precipita material orgánico e inorgánico). Se incubaron las muestras 5 minutos en hielo y se centrifugaron a 13,000 x g por 1 minuto, se

incubaron y centrifugaron a las mismas condiciones. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos de recolección limpios, se agregaron 1200 μL de la solución C4 (solución con alta concentración de sal) y se mezcló por 5 segundos.

- 4) Se colocaron las columnas MB Spin en tubos de recolección limpios de 2 mL y se agregaron 650 μL del sobrenadante más solución C4, se centrifugaron las muestras con las mismas condiciones y se desechó el flujo continuo, repitiendo este procedimiento hasta cargar el total de volumen. Se colocaron 500 μL de sobrenadante en la columna MB Spin y se centrifugo a 13,000 x g por 1 min. Se deshecho el flujo continuo y se repitió hasta el completo procesamiento del sobrenadante.
- 5) Después se agregaron 500 μL de solución C5 (solución a base de etanol) y se centrifugo a 13,000 x g por 1 min descartando nuevamente el flujo continuo y repitiendo la centrifugación. Se colocó cuidadosamente la columna MB Spin en un tubo de recolección limpio de 2 mL y se agregaron 100 μL de solución C6 (tampón de elución estéril) en el centro de la membrana de filtro blanco. Se realizó una última centrifugación a 13,000 x g por 1 min y se desechó la columna MB Spin. El DNA fue resguardado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

9.3 Cuantificación de DNA

Las muestras de DNA fueron descongeladas en hielo, homogenizadas, para posteriormente determinar su concentración a una absorbancia de 260 nm (A_{260}). Se estimó su pureza mediante la proporción A_{260}/A_{280} en el equipo Nanodrop. Para ello se colocó 1 μL de muestra en el pedestal del equipo asegurando cubrir la trayectoria de la luz y evitando la formación de burbujas. Una vez cuantificadas las muestras de DNA, se ajustó su concentración a 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ utilizando como diluyente H_2O grado biología molecular.

9.4 Análisis de la MI neonatal mediante qPCR del gen 16S rDNA

9.4.1 Oligonucleótidos

Para amplificar los fragmentos del gen 16S rDNA correspondientes a una secuencia universal presente en todas las bacterias, así como secuencias específicas de la familia *Enterobacteriaceae* y de los phylum Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria se utilizaron pares de oligonucleótidos reportados previamente en la literatura. En la tabla 2 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos sentido (F) y anti-sentido (R), el tamaño de los productos generados, la referencia bibliográfica de donde se obtuvieron las secuencias, y el factor de corrección empleado para la determinación del número de copias del gen/mg de heces.

Tabla 2 Características de los pares de oligonucleótidos				
Oligonucleótidos	Secuencia 5' → 3'	Tamaño producto (pb)	Referencia	Factor de corrección
Universal	F: ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT R: ATT ACC GCG GCT GCT GGC	197	12	2.16X10 ⁻¹⁰
Firmicutes	F: GGC AGC AGT (A/G)GG GAA TCT TC R: ACA C(C/T)T AG(C/T) ACT CAT CGT TT	484	46	5.3X10 ⁻¹⁰
Bacteroidetes	F: GGA (A/G)CA TGT GGT TTA ATT CGA TGA T R: AGC TGA CGA CAA CCA TGC AG	116	26	1.38X10 ⁻¹⁰
Actinobacteria	F: TGT AGC GGT GGA ATG CGC R: AAT TAA GCC ACA TGC TCC GCT	277	73	3.04X10 ⁻¹⁰
Enterobacteriaceae	F: GTG CCA GC(A/C) GCC GCG GTA A R: GCC TCA AGG GCA CAA CCT CCA AG	355	12	3.89X10 ⁻¹⁰

Para preparar las soluciones stock de oligonucleótidos, se centrifugaron brevemente los viales para asegurar que el pellet quedara en el fondo del tubo y a continuación se resuspendieron en agua estéril grado biología molecular de acuerdo con el contenido de nanomoles. Los nanomoles de oligonucleótido proporcionado por el fabricante (IDT) fueron multiplicados por 10, y el número resultante fue la cantidad necesaria de agua en µL para preparar una solución stock de 100 µM.

Los oligonucleótidos fueron resuspendidos dentro de una cabina de flujo laminar Clase II A/B3 y mezclados en vórtex hasta su disolución. Enseguida, se

prepararon alícuotas de trabajo a una concentración de 10 μM realizando una dilución 1/10 a partir del stock de 100 μM . Los oligonucleótidos fueron almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

9.4.2 Curva estándar

La curva estándar para cada par de oligonucleótidos se realizó preparando un stock de 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de DNA bacteriano que tuviera en su estructura la secuencia blanco. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 con H_2O grado biología molecular para obtener soluciones a 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 y 0.0002 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Para la reacción de qPCR se utilizaron 5 μL de cada solución por lo que se generó una curva estándar con 6 puntos de concentración: 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng (Figura 9).

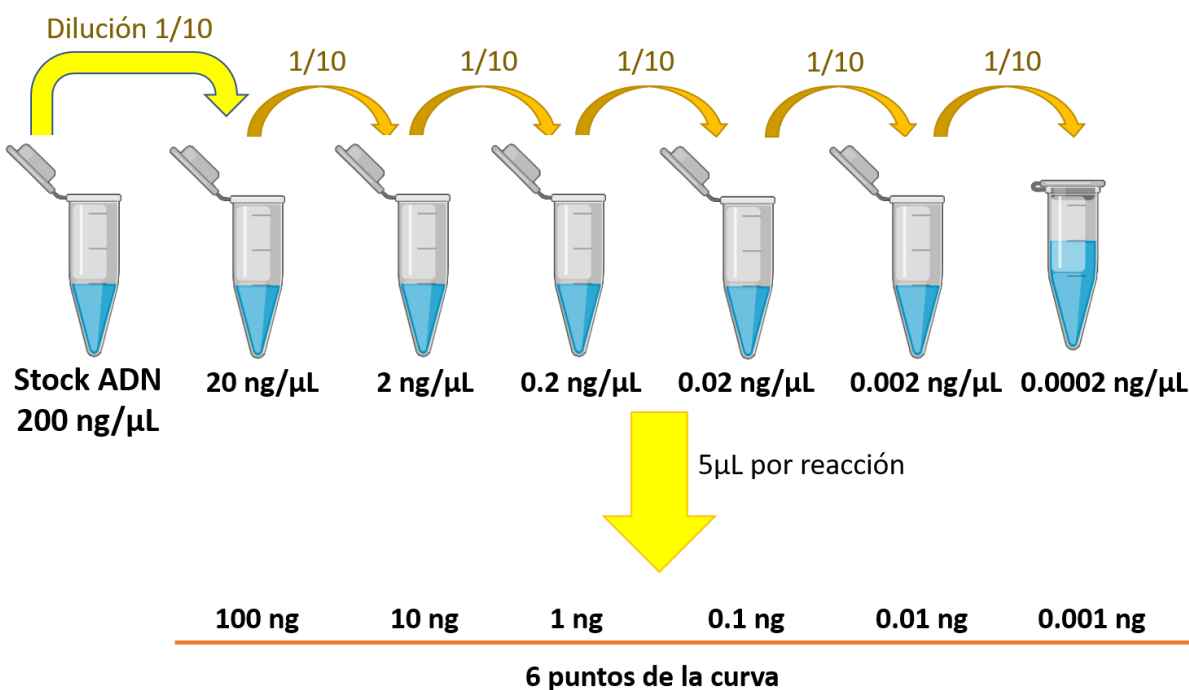


Figura 9 Generación de curva estándar para la cuantificación de DNA por qPCR. A partir de un stock de DNA bacteriano a 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ se realizan diluciones seriadas 1/10 para obtener los 6 puntos de concentración de la curva estándar: 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng.

9.4.3 Mezcla de reacción qPCR

La preparación de la mezcla de reacción de qPCR se realizó en la cabina de flujo laminar Clase II A/B3 manteniendo los reactivos y las muestras en hielo.

- 1) Se preparó la mezcla de reacción colocando en un tubo tipo Eppendorf de 150 μL la cantidad de los reactivos indicada en la Tabla 3 excepto el DNA.
- 2) Se mezclaron los componentes de la reacción y se añadieron 20 μL en cada tubo de qPCR.
- 3) Posteriormente se añadió el DNA de las muestras, curva estándar y controles.

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
2X Rotor-Gene SYBR Green PCR master mix	12.5 μL	1X
Oligo sentido (10 μM)	2.5 μL	1 μM
Oligo anti-sentido (10 μM)	2.5 μL	1 μM
Agua libre de RNasas	2.5 μL	---
DNA (5 ng/ μL)	5 μL	25 ng/reacción

9.4.4 Condiciones qPCR

La qPCR fue realizada en el termociclador Rotor-Gene® Q. El equipo fue programado siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La adquisición de los datos se realizó en el paso combinado alineamiento/extensión.

Paso	Tiempo	Temperatura	Comentario
<i>Activación</i>	5 min	95 °C	Activación de la DNA polimerasa HotStarTaq Plus
<i>Desnaturalización</i>	5 s	95 °C	
<i>Alineamiento/ Extensión</i>	10 s	60 °C	Recolección de datos de fluorescencia
Número de ciclos	35		

9.4.5 Electroforesis en gel de agarosa 2 %

Para validar los oligonucleótidos y corroborar la formación de un solo producto de amplificación del peso molecular reportado en la literatura, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos obtenidos de las reacciones de qPCR.

Brevemente:

- 1) Se pesaron 1.2 g de agarosa y se disolvieron en 60 mL de buffer Tris, Borato, EDTA (TBE) 0.5 X, se calentó brevemente la mezcla (se calentó en pasos de 15 segundos con agitación continua hasta su aclaramiento). Cuando la agarosa alcanzó una temperatura óptima se agregó 1 μ L del reactivo Radiant Smart Glow, mezclando ligeramente para no formar burbujas.
- 2) Se agregó la agarosa al molde para formar el gel y se colocó el peine para la formación de los pozos que contendrían las muestras, se dejó solidificar la agarosa aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se retiró el peine cuidadosamente.
- 3) Se agregó cantidad suficiente de buffer TBE 0.5 X para cubrir el gel y se programó la cámara de electroforesis a 80 volts por 5 minutos para permitir la filtración del buffer TBE en el gel.
- 4) Posteriormente se cargaron las muestras y el marcador de pesos moleculares de 100 pb y se efectuó la electroforesis a 80 volts por 75 minutos.
- 5) Una vez separadas las muestras, se colocó el gel en el transiluminador para observar las bandas con ayuda de luz UV.

9.5 Análisis estadístico

Los datos son presentados como la media \pm el error estándar (SEM). Los datos paramétricos (por ejemplo: SDG, peso, talla) de los grupos de estudio fueron analizados con análisis de varianza (ANOVA) de una vía con post-test de Tukey con el programa GraphPad Prism versión 5. Los datos no paramétricos (por ejemplo: tipo de alimentación, diagnósticos clínicos y resultados de cultivos) fueron analizados con χ^2 con el programa SigmaStat versión 2.03. El número de copias del gen 16S rDNA entre el grupo control y cada uno de los grupos de antibióticos fue comparado con la prueba t de Student no pareada de dos colas con el programa GraphPad Prism, o entre todos los grupos entre sí mediante ANOVA de una vía con post-test de Tukey. Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

10. Resultados

10.1 Formación de la cohorte y características de los grupos de estudio

Teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión del proyecto, se seleccionaron los neonatos prematuros candidatos a formar parte del estudio, y una vez obtenido el consentimiento informado de los padres, se inició el proceso de recolección y almacenamiento de muestras de heces neonatales. En un periodo de 7 meses se logró formar una cohorte de estudio de 21 neonatos prematuros clasificados en 4 grupos: i) **Control**, no tratados con antibióticos (n=6), ii) **A1**: tratados con AMP/AMK (n=6), iii) **A2**: tratados con TZP/VAN (n=3), iv) **A3**: tratados con la combinación de esquemas antibióticos incluyendo los anteriores, MEM y CLR (n=6).

En la Tabla 5 se describen los datos demográficos, antropométricos, diagnósticos clínicos y tipo de alimentación neonatales, así como los antecedentes infecciosos maternos de los grupos de estudio. La mayoría de los neonatos prematuros controles y tratados con antibióticos nacieron vía cesárea y presentaron similares SDG (\bar{x} =30.2), peso (\bar{x} =1208 g), talla (\bar{x} =38.2 cm) y perímetro cefálico (\bar{x} =27.6 cm) al nacimiento. Dentro de las características de alimentación, los grupos control y A3 tendieron a ser alimentados con leche humana exclusiva, mientras que los grupos A1 y A2 fueron alimentados con la combinación de leche humana y fórmula.

Con respecto a los antecedentes infecciosos maternos, no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de corioamnionitis, Ruptura Prematura de Membranas (RPM), infección materna y antibiótico prenatal entre los grupos de estudio. Al evaluar los diagnósticos clínicos neonatales asociados a procesos inflamatorios-infecciosos se encontró que los neonatos del grupo A1 cursaron en su mayoría con sepsis temprana, los del grupo A2 presentaron sepsis tardía y ECN, y los del grupo A3 desarrollaron choque séptico, sepsis temprana y tardía, ECN y neumonía.

Finalmente, un 67 % de los neonatos que recibieron tratamiento con TZP/VAN o combinaciones de antibióticos presentaron cultivos bacterianos positivos, mientras que en aquellos tratados con AMP/AMK solo se aislaron bacterias en un 33 % de los casos. Se recolectaron muestras de heces neonatales a partir del nacimiento y cada semana durante la estancia hospitalaria. No obstante, en este estudio nos enfocamos al análisis de la MI neonatal alrededor de los 30 días de vida extrauterina (DVEU) ya que a este tiempo la mayoría de los neonatos ya habían recibido al menos 1 o 2 esquemas antibióticos, además que la estancia hospitalaria de los neonatos control se concentra alrededor del mes de vida.

Tabla 5 Datos demográficos, antropométricos y clínicos de los grupos de estudio

	Control (n=6)	A1 (n=6)	A2 (n=3)	A3 (n=6)	P*
Datos de nacimiento, antropométricos y tipo de alimentación					
SDG	30.47 ± 0.49	30.47 ± 0.45	30.53 ± 0.31	29.35 ± 0.80	NS
Peso (g)	1289±54.76	1176±124.6	1215±239.4	1153±109.9	NS
Talla (cm)	38.58±0.82	37.83±1.41	38.5±2.75	37.83±1.05	NS
Perímetro cefálico (cm)	28.67±0.33	27.33±0.79	27.50±1.53	26.75±0.97	NS
Sexo femenino (%)	66.67	66.67	33.33	50	NS
Cesárea (%)	83.33	100	100	83.33	NS
LH (%)	83.33	33.33	33.33	66.67	NS
LH+Fórmula (%)	16.67	66.67	66.67	33.33	NS
Antecedentes infecciosos maternos					
Corioamnionitis (%)	0	0	0	16.67	NS
RPM (%)	33.33	33.33	33.33	50	NS
Infección materna (%)	66.67	50	33.33	33.33	NS
Antibiótico prenatal (%)	66.67	66.67	0	50	NS
Diagnósticos clínicos neonatales					
Choque séptico (%)	0	0	0	16.67	NS
Sepsis temprana (%)	0	66.67	0	66.67	0.021
Sepsis tardía (%)	0	0	100	50	0.003
ECN (%)	0	0	33.33	33.33	NS
Neumonía (%)	0	0	0	33.33	NS
Cultivos bacterianos					
Cultivo positivo (%)	0	33.33	66.67	66.67	0.004
Cultivo negativo (%)	16.67	66.67	33.33	33.33	0.004
Sin cultivo (%)	83.33	0	0	0	0.004

SDG: Semanas de gestación, LH: Leche humana, RPM: Ruptura prematura de membranas. Los datos paramétricos y no paramétricos se analizaron con ANOVA de una vía con post-test de Tukey y Chi², respectivamente. Una P<0.05 fue considerada estadísticamente significativa, NS: No significativa.

10.2 Validación de los oligonucleótidos Universal, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y *Enterobacteriaceae* por qPCR

Antes de iniciar la extracción de DNA y el análisis de la MI de las muestras de heces, se realizó un estudio piloto extrayendo el DNA de heces de neonatos prematuros que no ingresaron al estudio, para validar los oligonucleótidos y las condiciones de qPCR. En la Figura 10 se muestran las curvas de disociación obtenidas de la amplificación del gen 16S rDNA en muestras de DNA fecal neonatal probadas con los oligonucleótidos Universal, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y *Enterobacteriaceae*. Para cada una de las curvas de disociación observamos la formación de un pico indicando la amplificación de un solo producto y la ausencia de dímeros de oligonucleótidos, corroborando la especificidad de los oligonucleótidos probados. Además, no observamos la presencia de señal en nuestro control de no templado (NTC), el cual contiene todos los componentes de la reacción de qPCR excepto el DNA blanco.

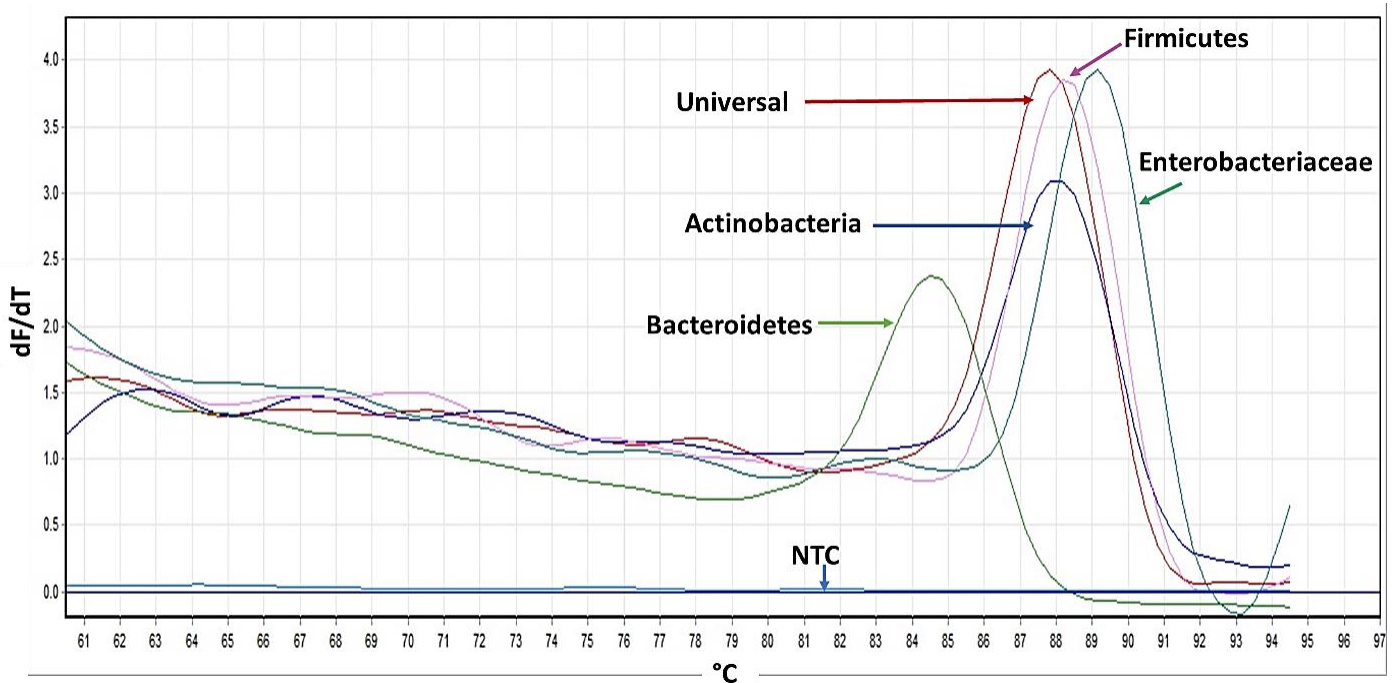


Figura 10 Curva de disociación correspondiente a los amplicones de los oligonucleótidos empleados.

Para verificar la formación de un solo producto de qPCR del peso molecular reportado en la literatura, se analizaron los amplicones generados con los oligonucleótidos Universal, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y *Enterobacteriaceae*, mediante electroforesis en geles de agarosa. En la Figura 11 se observa la presencia de una sola banda del peso esperado para los 5 pares de oligonucleótidos analizados. No obstante, llamó la atención que los productos de amplificación para Bacteroidetes y Actinobacteria, mostraron bandas difusas de baja intensidad lo cual coincidió con que sus amplicones mostraran valores elevados de Ct (baja amplificación) en las reacciones de qPCR con muestras de DNA fecal neonatal. Se modificó el número de ciclos de amplificación, así como el tiempo y temperatura del paso de alineamiento/extensión de la reacción, pero se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).

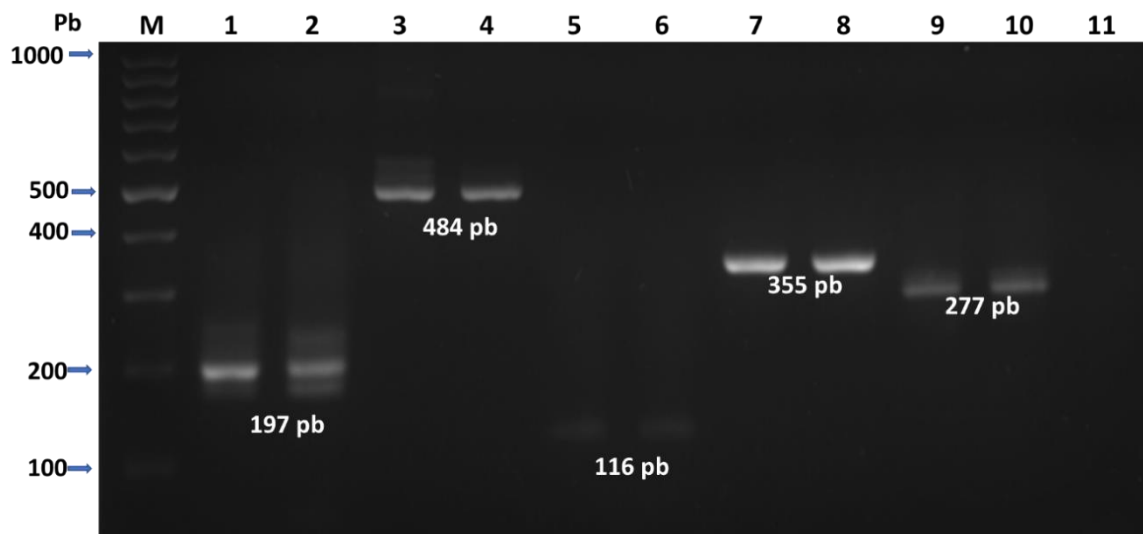


Figura 11 Análisis de los productos de qPCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Se muestran los productos de qPCR amplificados a partir del DNA extraído de heces neonatales con los oligonucleótidos Universal (carriles 1 y 2), Firmicutes (carriles 3 y 4), Bacteroidetes (carriles 5 y 6), *Enterobacteriaceae* (carriles 7 y 8), Actinobacteria (carriles 9 y 10), y el control de no templado (NTC, carril 11). A la izquierda del gel se muestra el marcador de pesos moleculares (M) en pares de bases (pb).

Debido a esto, se decidió volver al protocolo de qPCR original pero esta vez incluyendo como controles positivos de la reacción, el DNA extraído de las heces de un infante (3.5 años) y un adulto (23 años), ya que se esperaba encontrar en estas muestras una mayor abundancia de los phylum Bacteroidetes y Actinobacteria con respecto a los neonatos prematuros. Los amplicones generados con los oligonucleótidos de Bacteroidetes y Actinobacteria en las reacciones de qPCR con DNA de niño y adulto presentaron valores de Ct más bajos (alta amplificación) para estos phylum con respecto a los mostrados por el neonato (Tabla 6). Estos resultados indican que las condiciones de qPCR empleadas eran adecuadas y que la baja amplificación observada en las muestras de neonatos prematuros se debía a que estos phylum eran poco abundantes.

Oligonucleótido	Valor Ct neonato	Valor Ct niño	Valor Ct adulto
Actinobacteria	24.11	19.87	20.43
Bacteroidetes	28.58	8.49	9.61

Finalmente, se probaron los 5 pares de oligonucleótidos por qPCR a partir de la muestra de DNA de heces de adulto y se analizaron los productos mediante electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 12 se muestra la formación de una sola banda del peso molecular esperado para los oligonucleótidos Universal, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y *Enterobacteriaceae*, y la ausencia de bandas en los NTC y blancos de extracción.

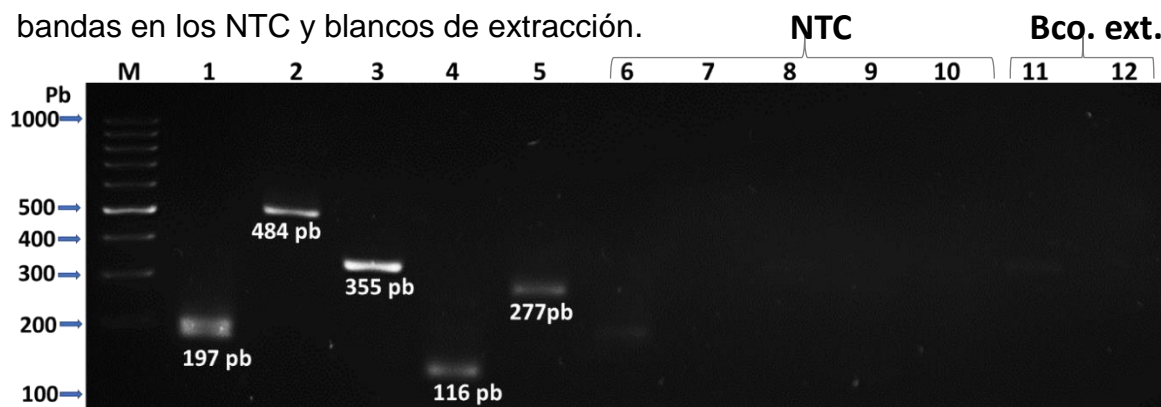


Figura 12 Validación final de los productos de qPCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se muestran los productos de qPCR amplificados a partir del DNA extraído de heces de adulto con los oligonucleótidos Universal (carril 1), Firmicutes (carril 2), *Enterobacteriaceae* (carril 3) Bacteroidetes (carril 4), Actinobacteria (carriles 5), Universal NTC (carril 6), Firmicutes NTC (carril 7), *Enterobacteriaceae* NTC (carril 8), Bacteroidetes NTC (carril 9), Actinobacteria NTC (carril 10), y blancos de extracción (carriles 11 y 12). A la izquierda del gel se muestra el marcador de pesos moleculares (M) en pares de bases (pb).

10.3 Características de las muestras de heces neonatales analizadas

En la Tabla 7, se muestran las características de las 21 muestras de heces neonatales analizadas, donde se indican los días de estancia hospitalaria del neonato, el tipo y duración del esquema antibiótico, los DVEU del neonato al momento de la toma de muestra, y los días transcurridos entre el día que concluyó el último tratamiento antibiótico y el día que se tomó la muestra de heces.

Los días de estancia hospitalaria fueron en promedio 42 días para el grupo control (Ctrl, n=6), 50 días para el grupo AMP/AMK (A1, n=6), 107 días para el grupo TZP/VAN (A2, n=3), y 58 días para el grupo de combinación de antibióticos (A3, n=6). La duración habitual de los tratamientos antibióticos fue de:

- i. AMP/AMK, 3-10 días
- ii. TZP/VAN, 7 días
- iii. MEM, 10-14 días
- iv. CLR, 14 días.

No obstante, cuando el tratamiento antibiótico fue iniciado empíricamente (por sospecha de infección en ausencia de cultivos bacterianos positivos), una vez que se descartó la infección y se obtuvieron resultados negativos de los cultivos bacterianos, se indicó la suspensión de la administración de antibióticos.

La toma de muestras de heces se realizó en promedio a los 29 días para el grupo Ctrl, 30 días para el grupo A1, 33 días para el grupo A2, y 38 días para el grupo A3. Tres de las 21 muestras analizadas correspondieron a los 44-59 DVEU debido a que no se recuperaron heces alrededor de los 30 días. También, se tuvo el caso de un neonato del grupo A3 del cual se analizó la muestra de heces del DVEU 19, ya que fue la última recolectada antes de que falleciera.

En cuanto al periodo transcurrido entre la terminación del último tratamiento antibiótico y la toma de muestra de heces, fue muy variable, oscilando de días a semanas e incluso algunos neonatos estaban cursando con tratamiento con antibióticos.

Siguiendo las instrucciones del kit QIAamp® PowerFecal® DNA, se realizó la extracción de DNA a partir de aproximadamente 200 mg de heces neonatales, aunque en algunos casos hubo poca cantidad de muestra y se emplearon entre 80 y 130 mg. En el proceso de extracción de DNA fecal, algunas muestras fueron de difícil manejo ya que se formaba un pellet no uniforme que no se ubicaba al fondo del tubo, por lo que se tuvo que repetir el paso de centrifugación.

En general, se obtuvieron bajas concentraciones de DNA de las muestras de heces neonatales (4.1-31.4 ng/μL, \bar{x} =12 ng/μL) (Tabla 8), mientras que para las muestras de niño y adulto se logró obtener aproximadamente 40 ng/μL. La mayoría de las muestras de DNA fecal neonatal (16 de 21) mostraron un cociente A260/280 entre 1.7-1.8 indicando una buena pureza del material genético (Tabla 8, columna derecha). Cocientes A260/280 bajos usualmente indican la contaminación de la muestra de DNA con los reactivos empleados en el protocolo de extracción, no obstante, a concentraciones de DNA <10 ng/μL el equipo Nanodrop puede arrojar valores inexactos.

Una vez cuantificadas las muestras de DNA fecal neonatal, se ajustó su concentración a 5 ng/μL con agua grado biología molecular, y se procedió a la cuantificación de bacterias totales, de los phylum Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria, y de la familia *Enterobacteriaceae* mediante qPCR del gen 16S rDNA.

Tabla 7 Características de las muestras de heces neonatales					
Grupo	Días estancia hospitalaria	Esquema antibiótico	Días tratamiento antibiótico	DVEU toma muestra	Días entre último tratamiento y toma muestra
Ctrl	35	NA	NA	21	NA
	35	NA	NA	30	NA
	32	NA	NA	30	NA
	53	NA	NA	31	NA
	52	NA	NA	31	NA
	47	NA	NA	29	NA
A1	32	AMP/AMK	7	28	21
	40	AMP/AMK	10	29	19
	66	AMP/AMK	6	34	27
	54	AMP/AMK	7	35	26
	40	AMP/AMK	3	28	23
	65	AMP/AMK AMP/AMK	8 3	27	6
A2	48	TZP/VAN	8	21	3
	53	TZP/VAN	7	33	17
	220	TZP/VAN	7	44	3
		TZP/VAN TZP/VAN	2 3		
A3	23	AMP/AMK MEM/VAN	4 6	19	4
	76	AMP/AMK TZP/VAN	7 7	56	40
	80	AMP/AMK TZP/VAN	10 10	59	15
	89	TZP/VAN TZP/VAN AMK	7 7 8	33	D4 tratamiento
	32	AMP/AMK CLR	3 14	28	D10 tratamiento
	50	TZP/VAN CLR	7 14	31	D3 tratamiento

NA: no aplica, AMP/AMK: ampicilina/amikacina, TZP/VAN: piperacilina-tazobactam/vancomicina, MEM: meropenem, CLR: claritromicina, DVEU: día de vida extrauterina, D: día.

Tabla 8 Concentración y pureza de las muestras de DNA fecal de neonatos			
Grupo	Heces (mg)	DNA (ng/ μ L)	DNA A260/280
Control	214.7	8.8	1.7
	220.3	10.7	1.49
	215.9	18.5	1.55
	98.5	9.9	1.85
	201.3	11.6	1.97
	84	12.8	1.86
A1	228.1	31.4	1.77
	210	6.1	2
	205	7.2	1.67
	82.1	10.2	1.81
	214.5	11.4	1.78
	204.3	4.1	1.66
A2	218.9	7.7	1.75
	200.9	17.1	1.57
	201.5	11.6	1.91
A3	204.7	6.7	1.77
	133.8	12.5	1.77
	202.8	25.8	1.81
	99.8	5.5	1.26
	208.9	5.9	1.56
	201.2	13.2	1.76

10.4 Análisis de la MI de neonatos prematuros mediante qPCR

Cada muestra de DNA fecal neonatal fue probada por duplicado con los oligonucleótidos Universal, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y *Enterobacteriaceae* mediante qPCR. La concentración de los productos de qPCR fue determinada a partir de la curva estándar generada para cada par de oligonucleótidos.

En la Figura 13, se muestra el ejemplo del diagrama de amplificación y la curva estándar correspondiente a los oligonucleótidos Universal. Los puntos correspondientes a la curva de calibración, que se realizó por duplicado y comprendió de 100 a 0.001 ng, fueron analizados y se obtuvo una eficiencia de 1 y

una $R^2=99.74$ (Figura 13 panel inferior). El valor de la eficiencia resulta de los valores de Ct y el logaritmo de la concentración de la muestra, un valor de 1 indica que teóricamente una secuencia blanco se duplica en cada ciclo.

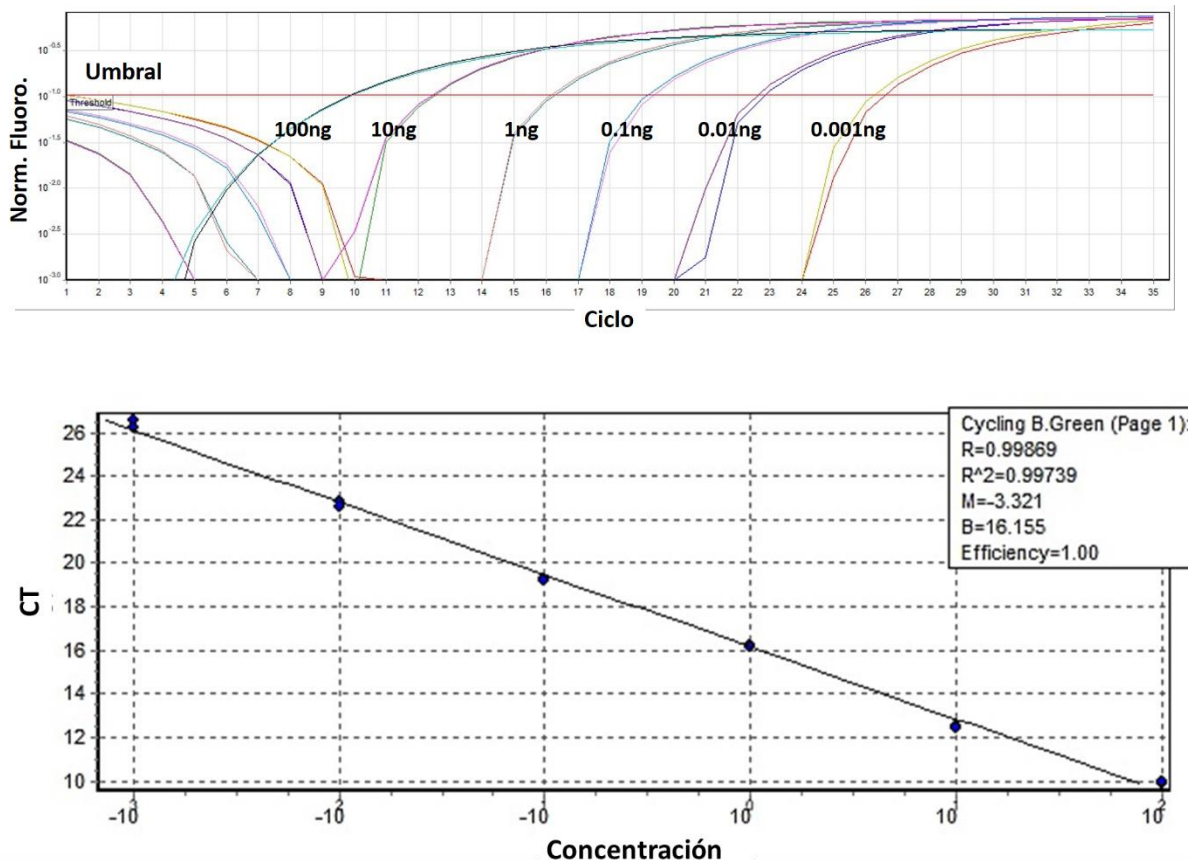


Figura 13 Diagrama de amplificación y curva estándar de los oligonucleótidos Universal. La curva estándar fue preparada por duplicado y correspondió a las concentraciones 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ng.

La abundancia relativa de bacterias totales determinada con los oligonucleótidos Universal fue similar entre los neonatos no tratados (Ctrl) y tratados con antibióticos (A1-A3) (ANOVA $p=0.41$) (Figura 14A). Asimismo, la administración de antibióticos tampoco alteró la abundancia relativa de la familia de Enterobacterias en los neonatos prematuros (ANOVA $p=0.50$) (Figura 14B).

En contraste, los neonatos tratados con la combinación de antibióticos TZP/VAN (grupo A2) mostrarán una menor cantidad de Actinobacterias en comparación con el grupo control (t-Student $p=0.017$), y con respecto al grupo de neonatos tratados con el esquema AMP/AMK (grupo A1) (ANOVA $p=0.024$) (Figura 14C).

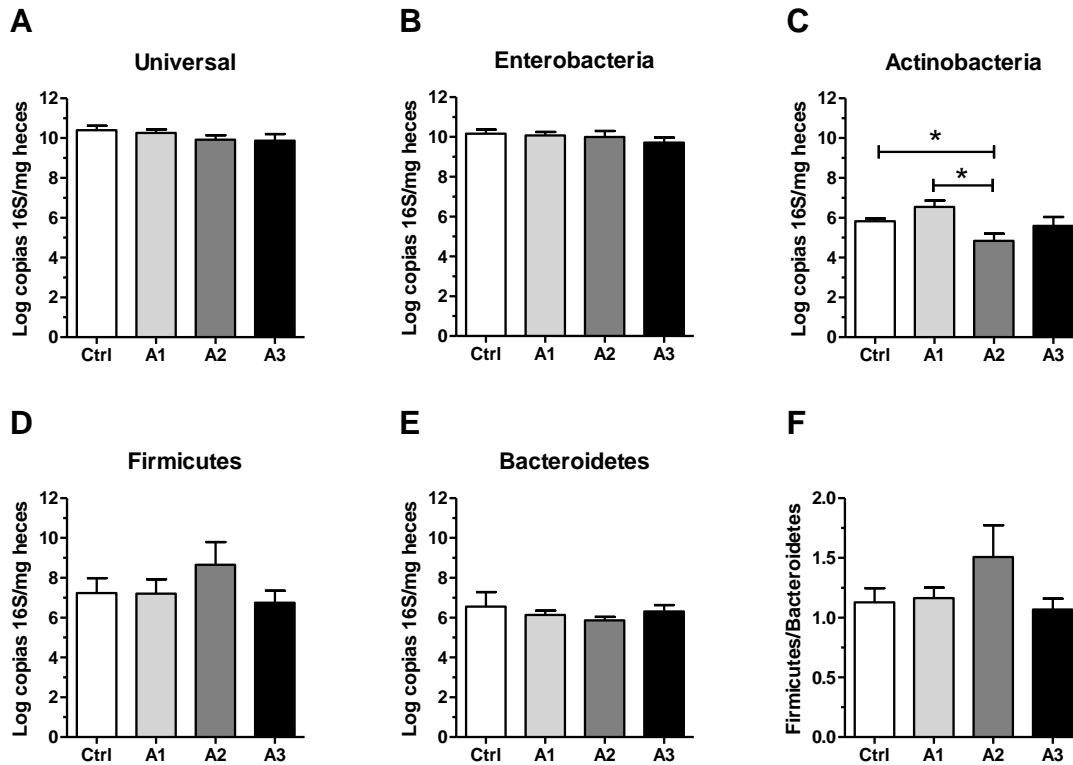


Figura 14 Análisis de la MI de neonatos prematuros no tratados y tratados con antibióticos. Se muestra el Log del número de copias del gen 16S rDNA por mg de heces para los oligonucleótidos Universal (A), Enterobacteria (B), Actinobacteria (C), Firmicutes (D), y Bacteroidetes (E), así como el cociente Firmicutes/Bacteroidetes (F) de los grupos control (Ctrl, n=6), A1 (n=6), A2 (n=3) y A3 (n=6). Se comparó el grupo Ctrl con cada uno de los grupos de antibióticos mediante la prueba t de Student no pareada de dos colas, y todos los grupos entre sí mediante ANOVA de una vía con post-test de Tukey. *P<0.05

En cuanto a los Firmicutes, se encontró que los bebés que recibieron esquemas de TZP/VAN (grupo A2) tendieron a presentar una mayor cantidad de estas bacterias con respecto al resto de los grupos de estudio (ANOVA $p=0.61$) (Figura 14D). No obstante, la abundancia relativa de Bacteroidetes fue similar en los neonatos no tratados y tratados con antibióticos (ANOVA $p=0.81$) (Figura 14E). A continuación, se calculó la proporción Firmicutes/Bacteroidetes y se encontró que esta fue de 1 para el grupo control y los grupos tratados con AMP/AMK (grupo A1) o la combinación de antibióticos (grupo A3), mientras que aquellos tratados con el esquema TZP/VAN (grupo 2) tendieron a mostrar una proporción de 1.5 (ANOVA

p=0.23) sugiriendo una mayor abundancia de Firmicutes con respecto a Bacteroidetes.

Finalmente, en general se observó una mayor abundancia relativa de bacterias totales y Enterobacterias en los neonatos prematuros, seguida de Firmicutes, Bacteroidetes, y Actinobacterias.

11. Discusión

En este estudio se analizó mediante qPCR del gen 16S rDNA, la abundancia relativa de bacterias totales, los phylum Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria, y la familia *Enterobacteriaceae* en muestras de heces de neonatos prematuros no tratados y tratados con antibióticos, para evaluar posibles alteraciones de la MI asociadas al uso de antibióticos. La técnica de qPCR permite hacer aproximaciones de la densidad de diversos grupos bacterianos determinando la cantidad de copias del fragmento diana (específico para cada phylum o familia) por miligramos de heces (Guo et al., 2008).

Diversos estudios señalan el papel que tiene la microbiota en el mantenimiento de la homeostasis y la relación de la disbiosis con múltiples enfermedades. Se sabe que una MI es favorecida por un nacimiento por canal vaginal y alimentación con leche materna, y que en neonatos pretérmino convergen distintos factores que evitan una colonización normal. Se piensa que la edad temprana (desde el nacimiento hasta los 2 o 3 años) es clave en la colonización y que disturbios de la MI pueden tener efectos negativos en la salud a corto y largo plazo.

Aunque se sabe que la colonización en neonatos pretérmino se ve alterada, algunos estudios refieren una afectación grave a la MI por el uso de antibióticos, pero que puede ser reversible con medidas como la alimentación con leche materna o uso de probióticos, con lo que los neonatos pretérmino pueden llegar a desarrollar una MI muy parecida a la de los neonatos sanos nacidos a término (Korpela et al., 2016; Nogacka et al., 2017).

La cohorte estudiada de neonatos prematuros incluyó un grupo control no tratado con antibióticos post-natales, y tres grupos tratados con antibióticos durante la estancia hospitalaria. Se analizaron 3 esquemas de antibióticos comúnmente empleados en neonatología para tratar infecciones bacterianas.

El esquema AMP/AMK se emplea como profilaxis en los casos de sospecha de sepsis debida a antecedentes infecciosos maternos, y en los casos de sepsis neonatal temprana, la cual se presenta durante las primeras 72 horas de vida

extrauterina. La sepsis neonatal temprana es ocasionada por la transmisión vertical de microorganismos de la madre. Una terapia antibiótica empírica temprana puede salvar la vida de los neonatos pero si no es la adecuada puede resultar en el aumento de la morbilidad y mortalidad (Jain & Unit, 2014). Esto es debido a que se puede propiciar el aumento de riesgo de sepsis o ECN por el aumento de la presión selectiva de los antibióticos que se relaciona con una pérdida de la diversidad bacteriana en la MI y un aumento de patógenos MDR.

El segundo esquema analizado fue TZP/VAN, el cual se administra en los casos de sepsis tardía (originada después de las 72 horas de vida) y en ECN. Y el tercero, incluyó los tratamientos anteriores combinados con MEM y CLR. MEM es empleado comúnmente cuando los cultivos bacterianos reportan bacterias productoras de BLEE (β -lactamasas de espectro extendido) y en los casos de choque séptico, mientras que CLR es administrada cuando se presenta neumonía originada por agentes atípicos.

Los grupos de estudio estuvieron conformados por: 6 neonatos controles, 6 neonatos tratados con AMP/AMK (grupo A1), 3 neonatos tratados con TZP/VAN (grupo A2), y 6 neonatos administrados con la combinación de esquemas antibióticos incluyendo MEM y CLR (grupo A3). Todos los sujetos de estudio mostraron similares SDG, datos antropométricos y tipo de alimentación. Tal como esperábamos, dentro del grupo A1 se ubicaron únicamente casos de sepsis neonatal temprana y en el grupo A2 los casos de sepsis tardía y ECN, mientras que el A3 comprendió casos de choque séptico, sepsis, ECN y neumonía.

Observamos que un 67 % de los neonatos que recibieron tratamiento con TZP/VAN o combinaciones de antibióticos presentaron cultivos bacterianos positivos, mientras que sólo el 33 % de los casos tratados con AMP/AMK reportaron crecimiento bacteriano. Es común que no se aislen bacterias en el 100 % de los casos en los que se administran antibióticos, debido a que en ocasiones el médico inicia el tratamiento antibiótico de manera empírica ante la sospecha o riesgo de infección, pero no se logra aislar un agente causal, y además existen bacterias difíciles de cultivar o no cultivables. En este último caso, un diagnóstico

molecular, por ejemplo, la detección de DNA bacteriano mediante qPCR, resulta de gran utilidad.

Durante el tratamiento con antibióticos tanto los patógenos como comensales están expuestos a su efecto. Las alteraciones en la MI es dependiente de múltiples factores, como: el espectro, la dosificación, duración del tratamiento, vía de administración, propiedades farmacocinéticas y farmacológicas (Jernberg, Lo, Edlund, & Jansson, 2007).

Los resultados mostraron que la abundancia relativa de bacterias totales, *Enterobacteriaceae* y Bacteroidetes, no fue alterada por el tratamiento con antibióticos en los neonatos prematuros a los 30 días de vida.

Con respecto a *Enterobacteriaceae*, grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas que concentra a la mayoría de las bacterias patógenas para el humano, en la MI adulta constituyen un grupo minoritario, sin embargo, en los neonatos son abundantes hasta que inicia la lactancia materna y se establecen bacterias como *Bifidobacterium*. Las Enterobacterias se han asociado con un aumento en la inflamación, algunos estudios refieren su aumento en enfermedades como la ECN (Pammi et al., 2017; Puerta & Mateos, 2010), se ha reportado su disminución con los tratamientos de TZP/VAN, MEM (Langdon et al., 2016; Sullivan et al., 2002).

Por otra parte, aunque no se detectan diferencias significativas en la abundancia relativa de Bacteroidetes (conformado por bacterias Gram negativas) entre los grupos de estudio, se observa cierta tendencia a que los neonatos tratados con TZP/VAN mostraran una menor cantidad de bacterias de este phylum. Esto podría deberse a que tazobactam tiene repercusión en Bacteroidetes (Avery et al., 2001; SVPP, 2007).

En contraste, se observa que los bebés tratados con TZP/VAN mostraron una menor abundancia de Actinobacteria en comparación con el grupo control, y también con respecto a los neonatos tratados con AMP/AMK. Actinobacteria es un phylum conformado en su mayoría por bacterias Gram positivas que tienen como

característica un alto contenido de G-C en su material genético (55 % en moles de DNA genómico). Algunas pueden ser patógenas para el humano (*Mycobacterium*, *Gardnerella*, *Nocardia*), sin embargo, es uno de los cuatro phylum comensales de la MI, representado por *Bifidobacterium spp* (Barka et al., 2016; Gao & Gupta, 2012).

Con respecto a la abundancia relativa de Firmicutes, se observan tendencias a que los neonatos tratados con TZP/VAN mostraran mayor cantidad de estas bacterias, mientras que aquellos que recibieron la combinación de antibióticos incluyendo MEM y CLR presentaron una menor cantidad, en comparación con los controles y los neonatos que recibieron tratamiento con AMP/AMK. El phylum de los Firmicutes es el más abundante de la MI y está formado principalmente por bacterias Gram positivas con bajo contenido de G-C.

En adición, al analizar la relación entre el contenido de Firmicutes y Bacteroidetes debido a que diversos estudios señalan que su desequilibrio está implicado en diversas enfermedades. Por ejemplo, se ha encontrado una disminución de Firmicutes y un aumento de Bacteroidetes a medida que los niños se vuelven autoinmunes (Giongo et al., 2011), y se ha observado una reducción en la proporción Firmicutes/Bacteroidetes en la enfermedad de Crohn y en diabetes tipo 1 (Murri et al., 2013). Aunque, no se detectan diferencias significativas en la proporción Firmicutes/Bacteroidetes entre los grupos de estudio, se observa una fuerte tendencia a que el grupo tratado con TZP/VAN mostrara una proporción de 1.5 mientras que el resto de los grupos presentó una proporción de 1.

Finalmente, comparando la abundancia relativa de la MI de neonatos prematuros analizada en este estudio, las bacterias totales y *Enterobacteriaceae* fueron las que mostraron una mayor cantidad, seguida por Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria. Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Arbolea y colaboradores (2015) donde compararon los principales phylum en neonatos pretérmino y término nacidos por canal vaginal y alimentados con leche materna, y encontraron que para el día 30 de vida los neonatos pretérmino presentaron abundantes Enterobacterias (más del 60%), seguidas por los Firmicutes y en

menor abundancia Actinobacteria y Bacteroidetes. Este patrón de densidad de los cuatro grupos de bacterias analizados y específicamente la abundancia de *Enterobacteriaceae*, también se ha reportado en estudios que caracterizan la MI de neonatos pretérmino a los 30 días de vida cuyas madres recibieron antibiótico prenatal (intraparto), observando que las alteraciones en la MI no se presentan en los primeros días de vida sino hacia el final del primer mes. En contraste, existen estudios que contradicen el efecto del uso de antibióticos maternos en el embarazo (Arbolea et al., 2015; Bailey, Field, Townsend, Rodger, & Brocklehurst, 2016; Nogacka et al., 2017). Dentro de este estudio, todos los grupos analizados excepto el tratado únicamente con TZP/VAN recibió antibiótico prenatal, por lo que resulta interesante evaluar la MI al nacimiento de estos neonatos y compararla con controles libres de este tratamiento.

Las muestras de heces de neonatos prematuros que se analizaron en este estudio fueron recolectadas alrededor de los 30 DVEU. Este punto de corte fue elegido debido a que a esa edad la mayoría de los bebés ya había recibido uno o varios esquemas de antibióticos, a excepción de algunas muestras recolectadas alrededor del día 19 o 40, debido a condiciones de los bebés y su tratamiento. Es posible que no se haya detectado diferencias significativas en la MI de los neonatos pretérmino debido al tiempo transcurrido entre el último esquema antibiótico recibido y la toma de muestras, ya que hay casos en los que habían pasado solo algunos días e incluso algunos donde todavía estaban siendo administrados esquemas antibióticos.

12. Conclusiones

La relevancia clínica de la disbiosis no está completamente esclarecida como tampoco lo está el verdadero efecto que ejercen los antibióticos en la MI de los neonatos. Nuestros resultados sugieren que la administración temprana de antibióticos en neonatos prematuros puede afectar a corto plazo la microbiota intestinal, en particular el tratamiento con tazobactam-piperacilina/vancomicina. Por ello, es importante corroborar estos resultados y extender el análisis a la determinación de especies comensales y patógenas involucradas en la homeostasis y disbiosis de la MI, así como realizar estudios prospectivos para evaluar los efectos a largo plazo del tratamiento con antibióticos.

13. Perspectivas

- Corroborar los resultados obtenidos estudiando un mayor número de neonatos de todos los grupos de estudio, considerando separar el grupo tratado con combinaciones de antibióticos para determinar si meropenem y claritromicina tendrían efectos similares o distintos en la MI.
- Ampliar la caracterización de la microbiota intestinal de neonatos prematuros mediante qPCR del gen 16S rDNA de géneros y especies comensales y patógenas.
- Evaluar la microbiota en días cercanos al nacimiento para valorar el efecto que podrían tener los antibióticos prenatales y determinar cómo estaba conformada la microbiota antes de la administración de los antibióticos.
- Realizar estudios a largo plazo para determinar si las alteraciones en la MI observadas pueden ser revertidas o si los neonatos presentarán disbiosis intestinal permanente lo cual los podría poner en riesgo de desarrollar enfermedades infecciosas, inmunes y metabólicas en la infancia y edad adulta.

14. Referencias

1. Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
2. Aguilera, P., Ruiz Tachiquín, M., Rocha Munive, M. G., Pineda Olvera, B., Cháñez Cárdenas, M. E., & Chain, P. (2015). Herramientas moleculares aplicadas en ecología. PCR en tiempo real. Retrieved January 28, 2019, from <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf>
3. Alexander, V. N., Northrup, V., & Bizzarro, M. J. (2011). Antibiotic exposure in the newborn intensive care unit and the risk of necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatrics*, 159(3), 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.02.035>
4. Arboleya, S., Sánchez, B., Milani, C., Duranti, S., Solís, G., Fernández, N., Gueimonde, M. (2015). Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *Journal of Pediatrics*, 166(3), 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.09.041>
5. Arboleya, S., Sánchez, B., Solís, G., Fernández, N., Suárez, M., Hernández-Barranco, A. M., Gueimonde, M. (2016). Impact of prematurity and perinatal antibiotics on the developing intestinal microbiota: A functional inference study. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms17050649>
6. Ardisson, A. N., De La Cruz, D. M., Davis-Richardson, A. G., Rechcigl, K. T., Li, N., Drew, J. C., Neu, J. (2014). Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS ONE*, 9(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090784>
7. Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Dimitriou, P. A., Thorson, L., Russell, S., Yurist-Doutsch, S., Finlay, B. B. (2015). Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Science Translational Medicine*, 7(307). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab2271>
8. Avery, G. B., Mary, F., & Mhairi, M. (2001). *Fisiopatología y manejo del recién nacido*. (M. Panamericana, Ed. 5th ed. Buenos Aires.
9. Azad, M. B., Bridgman, S. L., Becker, A. B., & Kozyrskyj, A. L. (2014). Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. *International Journal of Obesity*, 38(10), 1290–1298. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.119>
10. Bailey, S. R., Field, N., Townsend, C. L., Rodger, A. J., & Brocklehurst, P. (2016). Antibiotic prophylaxis for women undergoing caesarean section and infant health. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 123(6), 875–876. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.13701>
11. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H., Wezel, P. Van. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol*, 80(1), 1–44. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15.Address>
12. Barman, M., Unold, D., Shifley, K., Amir, E., Hung, K., Bos, N., & Salzman, N. (2008). Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. *Infection*

- and Immunity*, 76(3), 907–915. <https://doi.org/10.1128/IAI.01432-07>
13. Basilio, Y. H., Masera, J. J. R., & Morente, J. C. C. (2004). Eficacia de la monoterapia con piperacilina- tazobactam en infecciones del área maxilofacial. *Esp Cirug y Maxilofac*, 26, 97–106. Retrieved November 20, 2018, from http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-05582004000200005
 14. Bhalodi, A. A., van Engelen, T. S. R., Virk, H. S., & Wiersinga, W. J. (2019). Impact of antimicrobial therapy on the gut microbiome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(Supplement_1), i6–i15. <https://doi.org/10.1093/jac/dky530>
 15. Chernikova, D. A., Madan, J. C., Housman, M. L., Zain-ul-abideen, M., Lundgren, S. N., Morrison, H. G., Hoen, A. G. (2018). The premature infant gut microbiome during the first 6 weeks of life differs based on gestational maturity at birth. *Pediatric Research*, 84(1), 71–79. <https://doi.org/10.1038/s41390-018-0022-z>
 16. Collado, M. C., Cernada, M., Bäuerl, C., Vento, M., & Pérez-Martínez, G. (2012). Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes*, 3(4). <https://doi.org/10.4161/gmic.21215>
 17. Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., & Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports*, 6(March), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep23129>
 18. Cong, X., Xu, W., Janton, S., Henderson, W. A., Matson, A., McGrath, J. M., Graf, J. (2016). Gut microbiome developmental patterns in early life of preterm infants: Impacts of feeding and gender. *PLoS ONE*, 11(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152751>
 19. Cotten, C. M., Taylor, S., Stoll, B., Goldberg, R. N., Hansen, N. I., Sanchez, P. J., Benjamin, D. K. (2009). Prolonged Duration of Initial Empirical Antibiotic Treatment Is Associated With Increased Rates of Necrotizing Enterocolitis and Death for Extremely Low Birth Weight Infants. *Pediatrics*, 123(1), 58–66. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-3423>
 20. Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., & Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on humang-microbe mutualism and disease. *Nature*, 449(7164), 811–818. <https://doi.org/10.1038/nature06245>
 21. Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
 22. Ficara, M., Pietrella, E. (2018). Changes of intestinal microbiota in early life. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 7058, 1–11. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1506760>
 23. Gao, B., & Gupta, R. S. (2012). Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66–112. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05011-11>
 24. Giongo, A., Gano, K. A., Crabb, D. B., Mukherjee, N., Novelo, L. L., Casella, G., Hyo, H. (2011). Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *The ISME Journal*, 82–91. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.92>

25. Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*, 22(2), 14–19. <https://doi.org/10.1177/002215540305100703>
26. Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J., Zhao, H., & Wang, K. (2008). Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology*, 47(5), 367–373. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02408.x>
27. Hoskin-Parr, L., Teyhan, A., Blocker, A., & Henderson, A. J. W. (2013). Antibiotic exposure in the first two years of life and development of asthma and other allergic diseases by 7.5 yr: A dose-dependent relationship. *Pediatric Allergy and Immunology*, 24(8), 762–771. <https://doi.org/10.1111/pai.12153>
28. Hu, J., Nomura, Y., Bashir, A., Fernandez-Hernandez, H., Itzkowitz, S., Pei, Z., Peter, I. (2013). Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078257>
29. Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, 78(4), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.04.004>
30. Jain, N., & Unit, N. (2014). Monotherapy with Amikacin or Piperacillin-Tazobactam Empirically in Neonates at Risk for Early-Onset Sepsis : A Randomized Controlled Trial, 60(4), 297–302. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmu017>
31. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
32. Jernberg, C., Lo, S., Edlund, C., & Jansson, J. K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *International Society for Microbial Ecology*, 56–66. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.3>
33. Jiménez, E., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J. M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*, 159(3), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.007>
34. Koleva, P. T., Kim, J. S., Scott, J. A., & Kozyrskyj, A. L. (2015). Microbial programming of health and disease starts during fetal life. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 105(4), 265–277. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21117>
35. Korpela, K., Salonen, A., Virta, L. J., Kekkonen, R. A., Forslund, K., Bork, P., & De Vos, W. M. (2016). Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nature Communications*, 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms10410>
36. Kuperman, A. A., & Koren, O. (2016). Antibiotic use during pregnancy: How bad is it? *BMC Medicine*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0636-0>
37. Kuppala, V. S., Meinen-Derr, J., Morrow, A. L., & Schibler, K. R. (2011). Prolonged initial empirical antibiotic treatment is associated with adverse outcomes in premature infants. *Journal of Pediatrics*, 159(5), 720–725. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.05.033>
38. Langdon, A., Crook, N., & Dantas, G. (2016). The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0294-z>
39. Lorenzo, P., Moreno, J., Leza, J., Moro, M., Portolés, A. (2009). *Farmacología Básica y*

Clínica. A. Alberto, Ed. 18th ed. Buenos Aires: Madrid.

40. Lutfalla, G., & Uze, G. (2006). Performing Quantitative Reverse-Transcribed Polymerase Chain Reaction Experiments. *Methods in Enzymology*, 410(06), 386–400. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)10019-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)10019-1)
41. Rodríguez, M., & Rodríguez, W. (2006). Métodos físico-químicos en biotecnología: PCR en tiempo real. Retrieved December 18, 2018, from http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf
42. Madianos, P. N., Bobetsis, Y. A., & Offenbacher, S. (2013). Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: Pathogenic mechanisms. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(SUPPL. 14), 170–181. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12082>
43. Malmuthuge, N., & Griebel, P. J. (2018). Fetal environment and fetal intestine are sterile during the third trimester of pregnancy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.09.005>
44. Maranduba, C. M. D. C., De Castro, S. B. R., Souza, G. T. De, Rossato, C., Da Guia, F. C., Valente, M. A. S., Silva, F. D. S. (2015). Intestinal microbiota as modulators of the immune system and neuroimmune system: Impact on the host health and homeostasis. *Journal of Immunology Research*. <https://doi.org/10.1155/2015/931574>
45. Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), 231–241. <https://doi.org/10.1038/nature11551>
46. Mühlhling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J. C., & Joint, I. (2008). Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME Journal*, 2(4), 379–392. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.97>
47. Murri, M., Leiva, I., Gomez-Zumaquero, J. M., Tinahones, F. J., Cardona, F., Soriguer, F., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: A case-control study. *BMC Medicine*, 11(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-46>
48. Neu, J., Vento, M., Pérez-Martínez, G., Gormaz, M., Collado, M. C., & Cernada, M. (2015). Factors influencing gastrointestinal tract and microbiota immune interaction in preterm infants. *Pediatric Research*, 77(6), 726–731. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.54>
49. Nogacka, A., Salazar, N., Suárez, M., Milani, C., Arboleya, S., Solís, G., Gueimonde, M. (2017). Impact of intrapartum antimicrobial prophylaxis upon the intestinal microbiota and the prevalence of antibiotic resistance genes in vaginally delivered full-term neonates. *Microbiome*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0313-3>
50. O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7(7), 688–693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
51. Pammi, M., Cope, J., Tarr, P. I., Warner, B. B., Morrow, A. L., Mai, V., Neu, J. (2017). Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: A systematic review and meta-analysis. *Microbiome*, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0248-8>
52. Panduro, A. (2000). *Biología molecular en la clínica*. McGraw-Hill Interamericana. México.

53. Parra-Llorca, A., Gormaz, M., Alcántara, C., Cernada, M., Nuñez-Ramiro, A., Vento, M., & Collado, M. C. (2018). Preterm gut microbiome depending on feeding type: Significance of donor human milk. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01376>
54. Puerta, E. A., & Mateos, F. (2010). Enterobacterias. UNAM, México. Retrieved November 20, 2018, from http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf
55. Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S., & Isolauri, E. (2012). Microbial contact during pregnancy , intestinal colonization and human disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(10), 565–576. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.144>
56. Rinttilä, T. (2011). *REAL TIME PCR – A Molecular Approach to Investigate the Role of Intestinal Microbiota in the Pathophysiology of Irritable Bowel Syndrome*.
57. Rodicio, M., Mendoza, C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. [https://doi.org/2004;22\(4\):238-45](https://doi.org/2004;22(4):238-45)
58. Rutayisire, E., Huang, K., Liu, Y., & Tao, F. (2016). The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: A systematic review. *BMC Gastroenterology*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12876-016-0498-0>
59. Salvo, E., Alonso, C., Pardo, C., Casado, M., & Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 108, 686–695. <https://doi.org/10.17235/reed.2015.3846/2015>
60. Simreñ, M., Barbara, G., Flint, H. J., Spiegel, B. M. R., Spiller, R. C., Vanner, S., Zoetendal, E. G. (2013). Intestinal microbiota in functional bowel disorders: A Rome foundation report. *Gut*, 62(1), 159–176. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302167>
61. Stoll, B. J., Hansen, N., Fanaroff, A. A., Wright, L. L., Carlo, W. A., Ehrenkranz, R. A., Poole, W. K. (2002). Late-Onset Sepsis in Very Low Birth Weight Neonates: The Experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 110(2), 285–291. <https://doi.org/10.1542/peds.110.2.285>
62. Sullivan, Å., Edlund, C., & Nord, C. E. (2002). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet Infectious Diseases*, 1(2), 101–114. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(01\)00066-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(01)00066-4)
63. SVPP. (2007). *Manual de Antibióticos en Pediatría*, Medica panamericana. (2nd ed.). Caracas.
64. Tanaka, M., & Nakayama, J. (2017). Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergology International*, 66(4), 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.07.010>
65. Tang, W. H. W., Kitai, T., Hazen, S. L., Clinic, C., & Clinic, C. (2018). Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res*, 120(7), 1183–1196. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309715>

66. UNAM. (2007). Amikacina FacMed. Retrieved January, 19, 2019, from http://www.facmed.unam.mx/bmd/gi_2k8/prods/PRODS/Amikacina.htm
67. Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education, 29*(3), 151–159. <https://doi.org/10.1152/advan.00019.2005>
68. Virta, L., Auvinen, A., Helenius, H., Huovinen, P., & Kolho, K. L. (2012). Association of repeated exposure to antibiotics with the development of pediatric crohn's disease - A nationwide, register-based Finnish case-control study. *American Journal of Epidemiology, 175*(8), 775–784. <https://doi.org/10.1093/aje/kwr400>
69. Wandro, S., Osborne, S., Enriquez, C., Bixby, C., Arrieta, A., & Whiteson, K. (2018). The Microbiome and Metabolome of Preterm Infant Stool Are Personalized and Not Driven by Health Outcomes, Including Necrotizing Enterocolitis and Late-Onset Sepsis. *MSphere, 3*(3). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00104-18>
70. WHO. (2018). Nacimientos Prematuros. Retrieved from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>
71. Willyard, B. C. (2018). Baby's first bacteria. *Nature, 553*, 264–266.
72. Wopereis, H., Oozeer, R., Knipping, K., Belzer, C., & Knol, J. (2014). The first thousand days intestinal microbiology of early life: Establishing a symbiosis. *Pediatric Allergy and Immunology, 25*(5), 428–438. <https://doi.org/10.1111/pai.12232>
73. Yang, Y. W., Chen, M. K., Yang, B. Y., Huang, X. J., Zhang, X. R., He, L. Q., Hua, Z. C. (2015). Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces. *Applied and Environmental Microbiology, 81*(19), 6749–6756. <https://doi.org/10.1128/AEM.01906-15>
74. Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature, 486*(7402), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>