



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA" O.D.

TESIS

"EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA NASAL E INTESTINAL EN NEONATOS
NACIDOS EN EL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO "DR. EDUARDO
LICEAGA" O.D."

PARA OBTENER EL TÍTULO DE SUBESPECIALIDAD EN NEONATOLOGÍA

PRESENTA:

DRA. MARTHA ALICIA PÉREZ GOPAR

TUTORA DE TESIS:

DRA. ROSA MARÍA WONG CHEW

PROFESOR TITULAR B, JEFA DE LA SUBDIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN
CLÍNICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DR. CARLOS FERNANDO MOSQUEIRA MONDRAGÓN
JEFE DE SERVICIO DE PEDIATRÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
“DR. EDUARDO LICEAGA” O.D.

MAESTRA EN EDUCACIÓN MARÍA TERESA CHAVARRÍA JIMÉNEZ
COORDINADORA DE EDUCACIÓN DEL SERVICIO DE PEDIATRÍA DEL
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA” O.D.

DRA. ROSA MARÍA WONG CHEW
PROFESOR TITULAR B, JEFA DE LA SUBDIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN
CLÍNICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA UNAM

TÍTULO

EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA NASAL E INTESTINAL EN NEONATOS NACIDOS EN EL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO “DR. EDUARDO LICEAGA” O.D

ASESOR:

Dra. Rosa María Wong Chew

Profesor Titular B, Jefa de la Subdivisión De Investigación Clínica de la Facultad de Medicina UNAM

Teléfono: 56232298

Email: rmwong@unam.mx

ESTUDIANTE DE ESPECIALIDAD

Dra. Martha Alicia Pérez Gopar

Residente de segundo año de la subespecialidad de neonatología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga O.D.”

Teléfono: 551800-8276.

Email: martha.pegno@gmail.com

Índice:

1.	Antecedentes.....	5
2.	Justificación.....	8
3.	Marco teórico.....	9
4.	Pregunta de Investigación	17
5.	Planteamiento del problema	18
6.	Objetivo	18
7.	Hipótesis	18
8.	Diseño de investigación	19
9.	Material y Métodos	20
10.	Resultados	23
11.	Discusión	34
12.	Conclusiones	35
13.	Bibliografía	37

“Evaluación de la microbiota nasal e intestinal en neonatos nacidos en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” O.D.”

1. Antecedentes:

El término microbiota hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos, sus genes y sus metabolitos, que colonizan en un nicho ecológico determinado, como el tracto gastrointestinal, genitourinario, cavidad oral, nasofaringe, tracto respiratorio y piel. La microbiota humana es indispensable para el crecimiento corporal, desarrollo de la inmunidad, producción de vitaminas y nutrición, cuando ésta se altera podemos ver epidemias en la humanidad como el asma o la obesidad. Las alteraciones de la microbiota intestinal y la respuesta adversa del hospedero a estos cambios se le conoce como disbiosis.^{1,2} La microbiota intestinal es un reservorio para los genes de la resistencia antimicrobiana, ya que han encontrado en el microbioma del recién nacido, probablemente como consecuencia de una abundancia relativa de DNA de Proteobacterias, cuyo genoma contiene niveles elevados de estos genes.² Se conoce poco acerca de la función de la microbiota a través del tiempo, una de las principales diferencias entre la microbiota de un neonato y de un adulto son las funciones complejas y participación en el metabolismo de la vitamina B12 y folatos, siendo más funcionales en neonatos, ya que la microbiota intestinal del neonato es rica en genes *de novo* que participan en la biosíntesis de folato, que tiende a disminuir al paso de la edad y tiene relación con la cantidad de Bacteroidetes, Firmicutes y Archaea con la que se cuenta al momento del nacimiento. Algunos organismos que participan en la biosíntesis de la cobalamina son *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*.⁸

In utero, el ser humano carece de microbiota, es al nacer cuando el tracto gastrointestinal se coloniza inmediatamente, ya sea por parto o cesárea y por el tipo de alimentación que se le dé al nacer, lactancia materna o fórmula, ya que son

factores muy importantes en el desarrollo de la microbiota en el futuro, la cual, una vez establecida en el individuo es estable durante el tiempo. Existen situaciones que ocurren alrededor del nacimiento que incrementan el riesgo de desarrollar obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares en la etapa adulta, y la colonización inicial podría ser muy importante para determinar la composición final de la microbiota permanente en los adultos.

En los primeros dos años de vida, la microbiota está dominada por bifidobacterias, posteriormente, se diversifica y alcanza su máxima complejidad en el adulto con cientos de filotipos dominados por Bacteroidetes y Firmicutes. Se ha observado que en los miembros de la misma familia tienen comunidades bacterianas más parecidas entre ellos que en comparación con individuos no relacionados.

La evidencia demuestra que la microbiota es estable durante el tiempo, y que algunos efectos de la colonización del ser humano en etapas tempranas no son reversibles.

Se conoce como disbiosis al desequilibrio en el microbioma, en los humanos la disbiosis se ha asociado a una serie de trastornos gastrointestinales en los cuales podemos encontrar al hígado graso no alcohólico, enfermedad celíaca, asma, enfermedades inflamatorias crónicas y el síndrome de intestino irritable. Por lo que la microbiota intestinal tiene una relación estrecha con la salud y la enfermedad. La microbiota intestinal es la comunidad de microorganismos vivos residentes en el tubo digestivo del ser humano, es una de las comunidades más densamente pobladas, incluso más que el suelo, el subsuelo y los océanos, sin embargo; aún no se logra descifrar el genoma de la microbiota intestinal humana. La microbiota intestinal se puede considerar como un órgano metabólico, con funciones de nutrición, regulación de la inmunidad y la inflamación sistémica.

La microbiota intestinal ejerce un importante efecto sobre la respuesta inmune del humano, se ha demostrado que una disminución en la carga microbiana debido a

la elevación de los estándares de higiene en países desarrollados podría conducir a un incremento de las enfermedades autoinmunes, inclusive como posible explicación para el incremento en la incidencia de enfermedades inflamatorias como el asma, obesidad y la diabetes tipo 1.

La transmisión de enfermedades metabólicas de madre a hijo se cree que pueda ser multifactorial, incluye a la genética, epigenética y al ambiente en el cual se desarrolla. La exposición de un neonato a la obesidad materna o a una dieta alta en grasas durante el embarazo condiciona una marca metabólica en el sistema inmune del neonato que dura hasta la juventud, afectando directamente su microbiota, lo cual hará que sea propenso a presentar obesidad y enfermedades metabólicas.⁸

Las técnicas modernas de estudio de la microbiota nos han acercado al conocimiento de un número importante de bacterias que no son cultivables, y de la relación entre los microorganismos que nos habitan y nuestra homeostasis.

Existe controversia acerca de la microbiota en el feto y la placenta, hay teorías que determinan que el líquido amniótico y la placenta son estériles; sin embargo, hay algunos reportes de que existe una microbiota en la placenta y ésta puede estar relacionada con parto pretérmino.

Cada vez es más frecuente la realización de cesáreas en todo el mundo, no está aún estudiado al fondo, si está vía de nacimiento genera una disrupción entre la transmisión de la microbiota madre-hijo, únicamente conocemos que la microbiota vaginal es diferente a la que se puede obtener por vía abdominal; pero no conocemos con exactitud estas diferencias.⁶

Se ha descrito que los neonatos obtenidos por cesárea son más susceptibles a presentar alergias y asma, donde la administración de probióticos desde el nacimiento hasta los seis meses de edad reduce la incidencia de alergias, pero esto únicamente aplica para los nacidos por cesárea. También se ha observado de la lactancia materna enriquece la microbiota obtenida al nacer vía vaginal, ya que fomenta el desarrollo de bacterias formadoras de ácido láctico en el intestino.⁷

No se conoce si el recién nacido puede tener una microbiota nasal e intestinal en el momento del nacimiento o si es en días en los que la adquiere siendo estéril en las primeras horas, o si el modo de nacimiento (parto o cesárea) determine la presencia o no de gérmenes en el intestino o en cavidades nasales.⁴

2. Justificación:

Existe un período de ventana conocido como “los primeros mil días” que abarcan desde el periodo de embarazo hasta los dos primeros años de vida, esto se considera una ventana de oportunidad y es crucial para el desarrollo de salud en la etapa adulta. Conocer la implicación que tiene el tipo de nacimiento y las modificaciones que pueden existir en la microbiota, ya que esto podría ser la clave en el desarrollo de enfermedades inmunológicas y metabólicas.

El conocer y entender la relación del microbioma respiratorio e intestinal, cual es el papel de los probióticos y la programación metabólica permitirá tomar medidas preventivas, para disminuir las infecciones respiratorias y enfermedades crónico-degenerativas.

Es importante investigar el microbioma neonatal y como éste podría influir en el comportamiento y la frecuencia de las diversas enfermedades y patologías que pueden tener una relación estrecha, para realizar una acción preventiva y oportuna.

3. Marco Teórico:

Microbiota intestinal

Existen varios grupos de bacterias que conforman la microbiota humana, uno de ellos son las Proteobacterias, en donde podemos reconocer a *E. coli*, ya que es el más abundante de su grupo y tiene una capacidad metabólica importante, con gran potencial de adaptación ya que puede desarrollarse ante la presencia de oxígeno o nitrógeno. La colonización temprana con Proteobacterias y la reducción significativa posteriormente, es un paso indispensable para la salud del neonato, al existir una alteración en ésta reducción condicionará el incremento de enfermedades, sobretodo, en los recién nacidos de pretérmino. Cabe mencionar, que la reducción es controlada por el estado de salud y alimentación materna, ya que los oligosacáridos de la leche humana (HMOs) y la producción de IgA secretora juegan un papel fundamental en la supresión selectiva de proteobacterias durante el desarrollo de la microbiota intestinal temprana.⁹

Las proteobacterias son consideradas importantes contribuidores de la inflamación asociada a enfermedades metabólicas en los adultos; pero en la infancia, son primordiales para el desarrollo de la respuesta inmune innata y adaptativa. Uno de los componentes estructurales de éstas bacterias es la endotoxina lipopolisacaridasa (LPS), en donde ciertos estudios reconocen que una translocación de LPS del intestino a la circulación sistémica condiciona enfermedades metabólicas. Uno de los componentes de la LPS, lípido A, genera un balance entre la respuesta inmune innata entre la tolerancia homeostática y la pro-inflamatoria, se ha observado que cuando se altera éste balance, las proteobacterias pueden expresar una respuesta inmune evasiva a los lípidos A, incrementando la asociación y el riesgo de presentar enfermedades autoinmunes como diabetes tipo 1, aterosclerosis y alergias, ya que una de las funciones de

los lípidos A es evadir TLR4 y promover una inflamación crónica, secundario a una mala regulación de la respuesta inmune innata.⁹

Los cambios inmunológicos y metabólicos del feto ocurren durante el embarazo y tienen una relación directa con la microbiota materna. Durante el embarazo el sistema inmune fetal se adapta al materno y existe una tolerancia entre ambos, de igual manera pasa con la microbiota. Alteraciones en el índice de masa corporal, ganancia ponderal durante el embarazo, diabetes pregestacional o alguna comorbilidad asociada afectará la microbiota materna, por lo tanto la microbiota fetal también se verá afectada.¹¹

Es fundamental una adecuada nutrición materna para el desarrollo del microbioma neonatal, existen estudios en donde los neonatos de término nacidos vía vaginal y alimentados de seno materno exclusivamente, sin exposición a antibióticos, por el simple hecho de tener una madre con obesidad presentaron una reducción del 50% en proteobacterias, comparado con neonatos con una madre con un peso adecuado, condicionando a los hijos de madres obesas a presentar enfermedades metabólicas. Una de las teorías que podría explicar el por qué los hijos de madres obesas tienen menos proteobacterias y por consiguiente mayor riesgo de enfermedades inflamatorias se debe a una deficiencia de micronutrientes.⁹ Se han observado un aumento en los Bacteroidetes, *E. coli* y *Staphylococcus* en mujeres obesas o en mujeres que presentaron aumento excesivo de peso durante el embarazo, en comparación con las mujeres con peso adecuado, quienes presentan un aumento en *Bifidobacterium* y *Akkermansia muciniphila*.⁹

Actualmente la población ha cambiado su estilo de vida, en esta época se considera de dos tercios de las mujeres americanas se encuentra con sobrepeso u obesidad al momento de embarazarse.⁹ El hecho de que una mujer en edad fértil se encuentre con exceso de peso va a alterar su microbiota y por consiguiente la microbiota del neonato, trayendo consigo una transmisión intergeneracional de

enfermedades metabólicas, trayendo consigo una disfunción en el desarrollo del sistema inmune, volviendo al neonato propenso a presentar enfermedades crónicas inflamatorias.⁹

Una mala alimentación materna y un sobrepeso u obesidad, condicionará a la madre a una mala microbiota intestinal, la cual colonizará al recién nacido. La microbiota intestinal neonatal inicia en un ambiente aeróbico, permitiendo que ciertos microbios se desarrollen y colonicen, después vendrá una serie de fluctuaciones dramáticas en la composición del microbioma con el inicio de la lactancia y la alimentación complementaria.⁹

La lactancia materna es una fuente de bacterias vivas que contiene energía y recursos necesarios para la colonización y para prevenir que la colonización de bacterias patógenas. Al existir un estado de obesidad en la madre la leche materna incrementará la cantidad de *Staphylococcus* y *A. muciniphila*; disminuyendo los niveles de *Bifidobacterias* y alterando la composición de hormonas, citocinas y oligosacáridos.

Existen alrededor de 200 oligosacáridos de la leche humana (HMOs), hasta hace poco no se conocía su función ya que no son digeribles por el ser humano, pero proveen nutrientes a la microbiota para que ésta colonice de manera exitosa. Actualmente, se relacionan con el desarrollo y crecimiento del neonato.⁹

El estado de obesidad materno y la diabetes materna son los predictores más importantes para condicionar obesidad infantil e hígado graso no alcohólico de la infancia, siendo en algunos países la causa número uno de trasplantes hepáticos.⁹

La influencia materna para el desarrollo de la microbiota del neonato es fundamental, la idea que la colonización intestinal inicia *in utero* aún es controversial. Se conoce que la vía de nacimiento es uno de los factores

primordiales para la exposición y adquisición de microbiota, continuando con la lactancia materna ya que proporcionará nutrientes específicos para un buen desarrollo de microbiota por el contacto piel a piel.⁹

Además del desarrollo del sistema inmune, alguna de las funciones del microbioma es la síntesis de vitaminas, producir energía a través de la dieta ingerida. Una mal alimentación materna o un inadecuado estado de salud de la madre hará que no se desarrolle de manera correcta, convirtiéndose en un factor de riesgo para presentar obesidad, resistencia a la insulina, hígado graso no alcohólico desde la infancia.⁹

A nivel mundial se ha observado un incremento del 19.1% en la realización de cesárea. Se conoce que durante el parto vaginal bacterias específicas son transmitidas madre a hijo, las cuales son diferentes a los obtenidos vía cesárea y ésta diferencia es notoria desde los 3 días de vida. Sin embargo, existe la duda respecto al nacimiento vía cesárea si tiene un impacto negativo sobre la colonización de la microbiota intestinal neonatal, ya que no se logra entender si es la disrupción del eje de transmisión madre-hijo o es la alteración en la fisiología lo que generará los cambios a futuro.⁶ Se debe considerar que en ocasiones, la realización de cesáreas se debe por un embarazo múltiple, presentación pélvica, macrosomía o riesgo del bienestar materno – fetal, donde la microbiota ya se encuentra alterada. En el 50% de los neonatos con peso bajo para edad gestacional se observó que habían nacido vía cesárea, estos pacientes tienen un riesgo elevado para presentar desordenes metabólicos durante la infancia o en la etapa adulta y también se ha asociado a una alteración en la microbiota intestinal.⁶

Existe un periodo de llamado “ventana crítica” que ocurre en los primeros días de vida extrauterina, en este período se definirá la salud y el desarrollo del neonato. Se cree que la disrupción del eje de transmisión de microbiota madre-hijo esta

ligado a alergias, enfermedades crónico-inflamatorias y desordenes metabólicos. Es esencial conocer si existen diferencias en la colonización temprana de microbiota nasal e intestinal del neonato, para poder prevenir ciertas enfermedades.⁶

Se conocía creía que el feto se encontraba en un medio estéril, actualmente hay teorías que indican lo contrario.¹¹ Desde el nacimiento el neonato esta expuesto a diferentes microbios, incluyendo los maternos, siendo estos los más importantes ya que tienen un rol importante en la salud que tendrá en etapas futuras.⁷ Se han hecho múltiples estudios para comprender la composición de la microbiota neonatal y la transmisión de la misma, en algunos se reportan que las muestras obtenidas de la piel, mucosa oral y vaginal de la madres tomadas una hora antes del nacimiento y se tomaron muestras de los mismos sitios en neonatos a los cinco minutos de vida reportaron que la vía de nacimiento juega un papel muy importante, ya que los neonatos obtenidos vía vaginal tenían la misma microbiota vaginal que su mamá, sobresaliendo *Lactobacillus*, *Prevotella* y *Sneathia spp*; mientras los que se obtuvieron por cesárea la microbiota fue parecida a la microbiota de la piel materna sobre saliendo *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium spp*, se observó que la cefalosporina utilizada previamente a la realización de la cesárea no genero cambios en la microbiota. Los neonatos tienen al nacimiento una tolerancia inmunológica que es guiada por los linfocitos T de la madre, que deja que se colonicen por la microbiota materna.⁷ Hay reportes de estudios que los neonatos obtenidos por cesárea son más susceptibles a cierto patógenos, en comparación con los obtenidos vía vaginal; por ejemplo, los que son obtenidos por cesárea son 64 – 82% más susceptibles de presentar una infección por *Staphylococcus aureus metilcilino resistente (MRSA)*.⁷

Varios estudios nos reportan que la diferencia radica en la cantidad de bacteroidetes en lugar de la diversidad, sin embargo; no esta comprobado con exactitud.⁶ Existen reportes donde demuestran que los nacidos por cesárea tienen

más proporción de Bacteroidetes comparado con los nacidos vía vaginal.⁹ Lo que sí está demostrado es que el tipo la vía de nacimiento es un factor muy importante para desarrollar la microbiota intestinal y nasal en los recién nacidos.^{2,6,7} Debemos tomar en cuenta que a pesar de la transmisión vertical madre-hijo en el momento de nacimiento existe diferentes vías de colonización como lo es la exposición fecal, vaginal, piel y ambiente.⁶

Ciertos estudios reportan que la microbiota de la placenta es parecida a la de la cavidad oral, más que a la microbiota vaginal, fecal, dérmica o nasal, ya que incluye Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes y Fusobacteria Phyla. Dasanayake et al., reportaron que en las madres con *Actinomyces naeslundii* en cavidad oral, está asociado a prematurez y bajo peso al nacimiento, mientras que en las madres con predominio de lactobacilos se asocio a partos de término y peso elevado al nacimiento.¹¹

Una microbiota adecuada es esencial para el desarrollo normal y adecuada función de varios órganos como tracto respiratorio, pulmones, cerebro y sistema digestivo, entre otros, además de que juega un rol importante en la regulación del sistema inmune.^{3,5}

Después del nacimiento, la microbiota lleva un proceso de maduración, que inicia con pocas cepas, que se va desarrollando hasta configurarse en cinco grandes grupos dominados por *Bacteroidetes* o *Firmicutes*. La perturbación del desarrollo de la microbiota en el periodo de desarrollo tiene efectos negativos que se arrastran hasta la etapa adulta. El más común es el uso de antibióticos por afectar la proliferación y fomentar la resistencia antimicrobiana.⁵ La vía de nacimiento es fundamental para determinar la colonización inicial del neonato.¹³

La relación que existe entre el ambiente y salud materna durante la gestación afecta de manera directa como será la microbiota intestinal del neonato, y a su vez determinará el sistema inmune que tendrá en una etapa adulta.⁹

En los neonatos con madres con un mal estado de salud y que se obtuvieron vía vaginal se observó fueron colonizados por bacterias anaerobias como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *E. coli* y *enterobacterias*, las cuales generaban un ambiente favorable para la colonización de *Bacteroidetes*, *Bifidobacterias* y *Clostridium*, mediante el consumo de oxígeno, alteración del pH, produciendo dióxido de carbono y nutrientes.⁹

Se han reportado predominio de *Lactobacillus* y *Prevotella* que colonizan por parto vaginal. Se ha observado que en la primera semana de vida extrauterina los neonatos obtenidos por parto vaginal muestra un incremento de *Bifidobacterias* en comparación con los neonatos obtenidos por cesárea, y esta microbiota persiste durante los primeros tres meses de vida. Los neonatos obtenidos por cesárea presentan una colonización tardía de *Bacteroidetes* phylum y específicamente *Bacteroides* durante el primer mes de vida extrauterina, este atraso en la colonización se ha asociado al uso de antibióticos antes y durante la cirugía, así como la dificultad y retraso de lactancia materna durante la hora por el procedimiento quirúrgico y recuperación.^{11,12}

Se sabe la colonización de la microbiota intestinal es compleja, dinámica y se desarrolla durante los primeros años de vida y su maduración se lleva a cabo a la par de la maduración del sistema inmune. Alteraciones durante el periodo de colonización, factores ambientales o enfermedades en el huésped son determinantes para la salud que tendrá a futuro. Debido a la relación estrecha que existe entre el estado de salud del huésped y el desarrollo de la microbiota es de suma importancia conocer los antecedentes de importancia del hospedero como vía de nacimiento, alimentación con seno materno y estado de salud en los primeros 1,000 días de vida. Existen pocos estudios que respecto a la microbiota en mujeres gestantes y la relación entre la colonización y la maduración del sistema inmune.¹¹

Se han reportado bacterias en el meconio como *Enterococcus* y *Escherichia*, se cree que la vía de colonización es por vía transplacentaria y llegan al intestino fetal, aparte de las ya conocidas como la colonización vía vaginal por el tipo de nacimiento, este proceso confirmaría la teoría de una colonización in utero.¹¹

Microbiota respiratoria

Las vías respiratorias altas son colonizadas por una gran cantidad de bacterias que constituyen la microbiota respiratoria, las más conocidas son los patógenos, en éste grupo podemos encontrar *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*, por lo general son asintomáticas, pero tienen potencial para causar enfermedad. Otro grupo importante son los comensales, que no tienen potencial patogénico.³

No se tiene composición exacta de la microbiota nasal, ni sus efectos sobre la inmunidad o la resistencia a la colonización bacteriana, pero se sabe que modular la disbiosis o reconstituir el microbioma reduce las enfermedades respiratorias. Se cree que una disbiosis puede favorecer las infecciones por virus y múltiples factores como la vía de nacimiento, tipo de alimentación o uso de antibióticos pueden influir sobre la microbiota nasal en la etapa neonatal, inclusive se puede modular positiva o negativamente el desarrollo de ésta.³

Se ha evidenciado que la lactancia materna exclusiva fomenta un adecuado microbioma, comparado con la alimentación de sucedáneos de leche humana. Se cree que la protección que otorga la lactancia materna a la microbiota nasal está relacionada por el alto contenido de *Corynebacterium* spp y *Dolosigranulum* sp; mientras que las fórmulas se encuentra bacterias anaerobias como *Prevotella* y *Veillonella*, así como *Staphylococcus*.³

Se han identificado cuatro grupos de bacterias que pueden aumentar o disminuir el riesgo de presentar colonización *S. Pneumoniae* y el desarrollo de otitis media

aguda. Se cree que los pacientes que están colonizados con *Corynebacterium*, *Dolosigranulum*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Proteobacteria* no clasificada y *Staphylococcus* tienen un menor riesgo, comparado con los que están colonizados con *Pasteurellaceae*, *Moraxella* o *Haemophilus*, y con *Veillonella*, *Rothia*, *Actinomyces* o *Neisseria*, estos últimos con mayor riesgo de presentar colonización para *S. Pneumoniae* o de presentar cuadros de otitis media aguda.³

Se sabe que el asma es una enfermedad multifactorial en la cual existe una inflamación del tracto respiratorio e hiperplasia del músculo liso, muchos estudios señalan que es una enfermedad que se consolida en la infancia y progresa a la etapa adulta volviéndose una enfermedad crónica. La microbiota juega un papel muy importante, ya que el rinovirus está vinculado al desarrollo del asma. Estudios reportan que las personas con asma alérgica tienen una respuesta humoral disminuida contra patógenos, disminuyendo la producción de anticuerpos específicos IgG y IgE, generando una disbiosis que puede provocar una infección por virus o bacterias y puede incrementar la respuesta inflamatoria y daño tisular.³

Debido a que se ha postulado que el ambiente en el útero es estéril, se ha hipotetizado que las vías respiratorias en el momento del nacimiento también son estériles. No se conoce si los neonatos nacen ya con algún tipo de colonización o si la adquieren durante los siguientes días y si el tipo de nacimiento condiciona diferencias en el microbioma respiratorio.

4. Pregunta de Investigación:

¿Existen diferencias en el microbioma nasal e intestinal en un recién nacido en las primeras horas de vida de acuerdo al tipo de nacimiento?

5. Planteamiento del problema:

A pesar de los avances teóricos y tecnológicos en la medicina, hemos escuchado muy poco acerca de la importancia que tiene la microbiota en el ser humano y su relación con ciertas enfermedades. En nuestro país tenemos un incremento significativo de obesidad y de enfermedades crónico-degenerativas que tienen un inicio, desde la etapa fetal por la relación estrecha que se tiene con el microbioma materno, sin embargo; se ha descrito el microbioma intestinal de recién nacidos en los primeros días de vida en los que se colonizan, pero no se conoce con exactitud si los neonatos presentan microbioma intestinal y nasal al nacimiento y cuál es su composición de acuerdo con la vía de nacimiento. ¹

6. Objetivo:

Determinar y comparar la microbiota intestinal y respiratoria en los recién nacidos obtenidos por cesárea y por parto eutócico.

7. Hipótesis

Se encontrarán diferencias en la composición taxonómica del microbioma respiratorio e intestinal en recién nacidos de acuerdo con el tipo de nacimiento.

8. Diseño de investigación:

Tipo de estudio: transversal, prospectivo, descriptivo y traslacional.

Población: recién nacidos sanos y de término, nacidos en el Hospital General de México.

Criterios de inclusión:

1. Recién nacidos sanos de término.
2. Nacimiento por parto vaginal o cesárea.
3. Consentimiento informado por los padres o tutores.

Criterios de exclusión:

1. Recién nacidos pretérmino.
2. Comorbilidades.

Criterios de eliminación:

1. No cuenten con consentimiento informado.
2. No contar con las muestras de heces y lavados nasales.

Variables

Independiente

1. Nacimiento vía cesárea o parto eutócico

Dependiente

1. Microbioma respiratorio e intestinal

Demográficas

1. Peso
2. Talla
3. Género

9. Material y Métodos:

Procedimiento del estudio.

Reclutamiento de pacientes:

Se invitó a las madres a que sus bebés menores de 24 horas de vida participaran en el estudio y se obtuvo el consentimiento informado de los padres o tutores.

El estudio se realizó en el área de hospitalización de Habitación conjunta del Servicio de Pediatría del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga O.D."

Se tomaron las muestras de lavados nasales y heces y el procesamiento de muestras se realizó en el laboratorio de Investigación en Enfermedades infecciosas, de la División de Investigación en la Facultad de Medicina de la UNAM.

Lavados nasales:

Los pacientes se ubican acostados sobre su costado, sobre una camilla y sostenidos por la madre. Mediante una jeringa, un operador instila 1 a 1.5 ml de suero salino estéril en una narina, mientras se inmoviliza la cabeza del niño ligeramente inclinada hacia atrás, sosteniéndola por la frente. Utilizando una punta de plástico roma conectada a una jeringa, después de instilar la solución fisiológica inmediatamente después se aspira el fluido instilado. Este se coloca en un tubo que contiene medio viral. El mismo procedimiento se realiza en la narina opuesta. Una vez finalizado el lavado se agrega un estabilizador viral que contiene anfotericina B 2.5 mg/mL, penicilina G 10,000 UI/mL, sulfato de estreptomicina 50,000 Mg/mL y albúmina bovina al 0.5%. Se cierra el tubo con una tapa rosca, se invierte varias veces para mezclar la muestra con el estabilizador y se deposita en un recipiente con hielo para su transporte al refrigerador y su envío al laboratorio.

Pruebas de laboratorio

Extracción de DNA y secuenciación masiva de ADN para análisis metagenómico

Los lavados nasales y las heces se enviaron al laboratorio de Investigación en Enfermedades infecciosas, de la División de Investigación en la Facultad de Medicina de la UNAM, a partir de los cuales se realizó la extracción de ADN de las muestras de heces y lavados nasales utilizando el kit para microbiota (Qiagen). Posteriormente, se controló la calidad de ADN por métodos espectrofotométricos y electroforesis. Para la preparación de librerías de secuenciación; se realizó la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región V3-V4 de la subunidad 16S de la RNA polimerasa de procariotas (estrategia ampliamente utilizada en estudios metagenómicos), seguido de la obtención de amplicones para cada muestra y purificación de estos productos de PCR. Posteriormente a cada amplicón se ligó por PCR códigos de barras como identificadores de muestras y adaptadores para secuenciación masiva compatibles con la tecnología de Illumina.

Para cada muestra se realizó una mezcla equimolar de éstas y se secuenciaron en el secuenciador de Illumina que permite 600 ciclos, es decir secuenciación en ambas direcciones de la hebra de ADN (forward y reverse, pair-end) de 300 pares de bases cada una. Se realizó un respaldo y almacenamiento de datos de secuenciación y posteriormente el análisis bioinformático de los datos de secuenciación, identificación taxonómica de la microbiota presente en cada muestra de acuerdo a variaciones en la región amplificada V3-V4 de la subunidad 16S de la RNA y un análisis estadístico de asociación entre parámetros clínicos, de cada paciente con los datos taxonómicos.

Análisis estadístico

Se realizó una base de datos con las variables de medición, se describieron las variables con medidas de tendencia central y dispersión, se realizó la comparación

de datos cuantitativos con distribución normal utilizando una t de student o U de Mann Whitney para las variables con distribución no paramétrica y chi cuadrada para las variables cualitativas. Se considera una $p < 0.05$ como significativa.

Para el análisis taxonómico se utilizó Qiime II.

Consideraciones éticas

Se solicitó el consentimiento informado de todos los padres o tutores de los niños que participaron en el estudio. El estudio fue sometido a los comités de investigación y ética del Hospital General de México y de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Este estudio se conduce de acuerdo a las normas de ética sobre investigación en sujetos humanos de la declaración de Helsinki, la Ley General de Salud y el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de la investigación para la salud.

Consideraciones de bioseguridad

Las muestras fueron tomadas, selladas y enviadas para su procesamiento al laboratorio de la UNAM dentro de bolsas de plástico y contenedores con congelantes dentro de cajas de unicel. Posteriormente se enviaron a la UNAM para el análisis del cDNA para estudios de metagenómica.

El laboratorio de Investigación en Enfermedades infecciosas, de la Facultad de Medicina de la UNAM realiza sus prácticas de bioseguridad para el desecho de residuos peligrosos biológico infecciosos en bolsas rojas y contenedores rojos de plástico para punzocortantes, de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 y al reglamento de desecho de productos biológico infecciosos del Hospital General de México.

10. Resultados

Se incluyeron en el estudio 30 niños nacidos por parto fisiológico y 30 niños nacidos por cesárea, nacidos entre enero y diciembre del 2018 en el servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General de México. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las características demográficas entre los 2 grupos como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Características demográficas de los recién nacidos. No se observaron diferencias significativas en las características demográficas de los RN obtenidos por parto fisiológico o cesárea.

	Fisiológico n=30	Cesárea n =30	p
Femenino, n (%)	14 (46)	17 (56)	0.34
Masculino, n (%)	16 (54)	13 (44)	
Peso, kg (x+EE)	3.11+0.39	3.03+0.33	0.57
Talla, cm (x+EE)	49+1.7	49+1.99	0.58

Se realizó la extracción del DNA de las muestras y PCR punto final para detectar la región variable V3-V4 de 16S bacteriano y se obtuvo:

En los lavados nasales de los RN hubo una detección de V3-V4 mediante PCR de un 10% en cesárea vs 50% en parto vaginal (Figura 1).

En las muestras de meconio de los neonatos obtenidos vía cesárea hubo una detección de V3-V4 en 46% vs 53% vía vaginal (Figura 2).

Figura 1. Detección de V3-V4 en lavados nasales de neonatos nacidos por cesárea (A) y por parto eutócico (B).

A

B

Figura 2. Detección de V3-V4 del 16S en heces de neonato nacidos por cesárea (A) o parto eutócico (B).

A

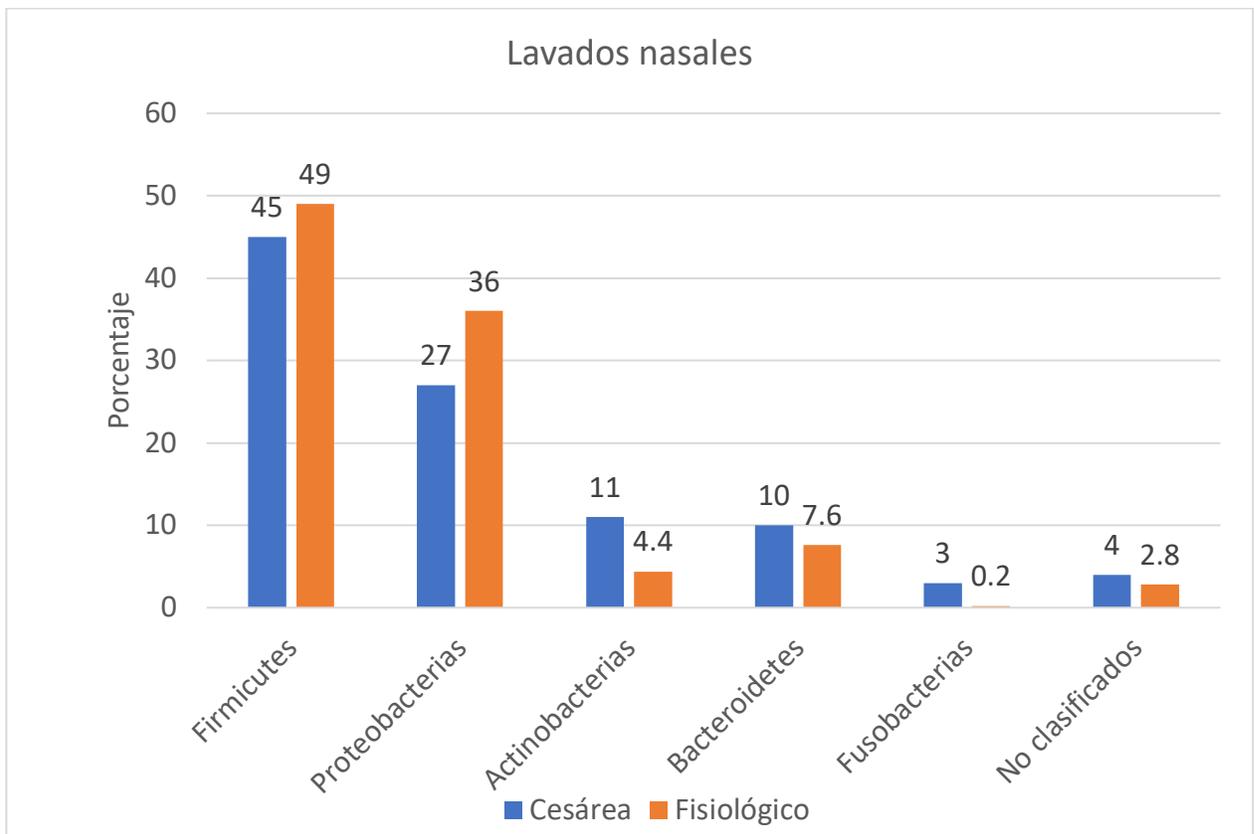
B

ANÁLISIS TAXONÓMICO

Se detectó material genético en 30% de lavados nasales (cesárea y parto eutótico) de RN y 100% de heces de los RN mediante secuenciación masiva.

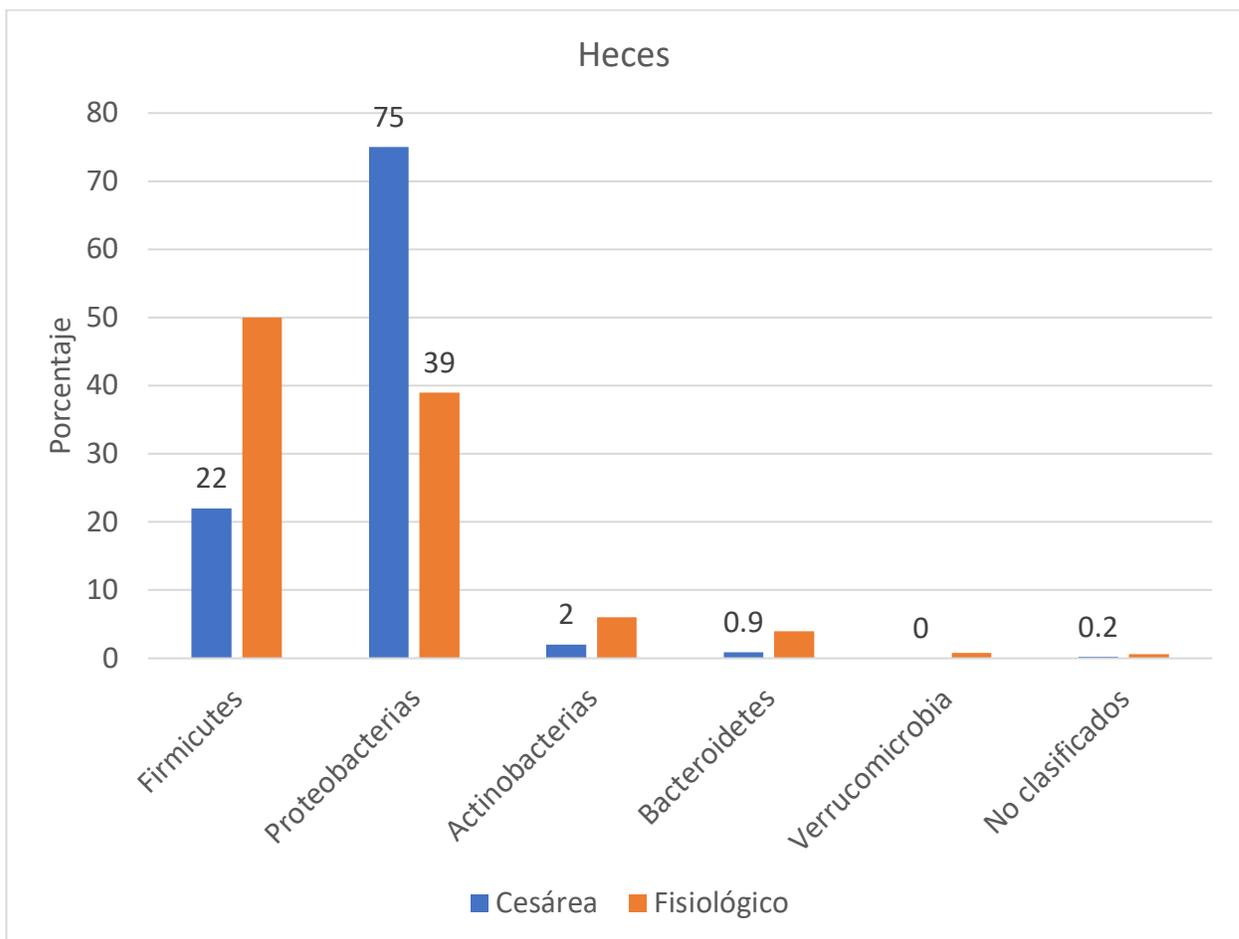
En los lavados nasales de recién nacidos obtenidos por cesárea vs parto vaginal se encontró Firmicutes 49% vs 45%, Proteobacterias 36% vs 27%, Actinobacterias 4.4% vs 11%, Bacteroidetes 7.6% vs 10%, Fusobacterias 0.2 vs 3% y no clasificados 2.8% vs 4%, respectivamente (Figura 3). No hubo diferencias significativas en la proporción en el *Phylum* de acuerdo con el tipo de nacimiento.

Figura 3. Proporción de *Phylum* bacteriano en lavados nasales de recién nacidos obtenidos por cesárea y por parto eutótico.



El análisis filogenético mostró en las heces de recién nacidos a nivel de *Phylum* cesárea vs parto vaginal: Firmicutes en 50% vs 22%, Proteobacterias en 39% vs 75%, Actinobacterias 6% vs 2%, Bacteroidetes 4% vs 0.9%, Verrucomicrobia 0.8% vs 0% y no identificados 0.6% vs 0.2%, respectivamente (Figura 4). Encontrando diferencias significativas en la proporción de Firmicutes y Proteobacterias, en las que los RN obtenidos por cesárea presentan más Firmicutes y los nacidos por parto eutrófico mayor proporción de Proteobacterias.

Figura 4. Proporción del Phylum del microbioma intestinal de recién nacidos obtenidos por cesárea y parto eutrófico.



Un análisis más detallado a nivel de género en los lavados nasales de neonatos obtenidos por cesárea se detectó Enterobacterias 12%, Streptococcus 32%, Lactobacillae 3%, Staphylococcus 14%, Clostridiales 2.8%, Escherichia-Shigella 22%, Enterobacteriaceae 13%, Acinetobacter 1%, Bifidobacterium 4%, Actinomycetales 2%, Bacteroides 2%, Flavobacteriaceae 1% (Figura 6); y en el meconio de RN por parto vaginal Enterobacteriaceae 27%, Escherichia Shigella 47%, Clostridiales 18%, Sarcina 1%, Leuconostoc 1%, Bifidobacterias 1% (Figura 5).

Figura 5. Análisis taxonómico del microbioma de lavados nasales de neonatos nacidos por parto eutócico

Figura 6. Análisis taxonómico del microbioma de lavados nasales de neonatos nacidos por cesárea

Un análisis más detallado a nivel de género en el meconio de RN obtenidos por cesárea se detectó *Enterococcus* en 20%, *Streptococcus* 2%, *Lactobacillae* 1%, *Staphylococcus* 22%, *Clostridiales* 2%, *Escherichia-Shigella* 22%, *Enterobacteriaceae* 13%, *Acinetobacter* 1%, *Bifidobacterium* 4%, *Actinomycetales* 2%, *Bacteroides* 2%, *Flavobacriacea* 1% (Figura 7) ; y en el meconio de RN por parto vaginal *Enterobacteriaceae* 27%, *Escherichia Shigella* 47%, *Clostridiales* 18%, *Sarcina* 1%, *Leuconostoc* 1%, *Bifidobacterias* 1% (Figura 8).

Figura 7. Análisis taxonómico del microbioma de las heces de recién nacidos obtenidos por cesárea.

Figura 8. Análisis taxonómico del microbioma de heces de neonatos nacidos por parto eutócico.

11. Discusión

Sabemos que la vía de nacimiento es uno de los factores más importantes para la colonización de la microbiota en un recién nacido y eso tiene un resultado en la salud que tendrá en la etapa adulta.

Hoy en día, conocemos la relevancia que tiene un buen apego al control prenatal y a la programación metabólica previo a la concepción, ya que el feto se adaptará al ambiente intrauterino y es capaz de presentar una respuesta al estímulo externo.⁴

Una alteración en el ambiente o en el hospedero puede desencadenar problemas metabólicos como obesidad, alergias, diabetes, enfermedades inflamatorias intestinales y enfermedades cardiovasculares en la vida adulta. En México existe un incremento significativo de obesidad y de enfermedades crónico-degenerativas que tienen un inicio desde la etapa fetal, por la relación estrecha que se tiene con el microbioma materna.

Hasta el momento, no conocíamos con exactitud cual era la microbiota respiratoria de un neonato, sabíamos que los recién nacidos obtenidos por cesárea son más susceptibles a presentar problemas de alergias y asma, así como enfermedades inflamatorias intestinales en la etapa adulta; esto se cree que esta asociado por la baja la falta de colonización por esta vía de nacimiento.⁷

Pudimos observar que en los recién nacidos obtenidos por cesárea, en los lavados nasales sólo obtuvo un 10% de detección de material genético microbiano mediante PCR. Sin embargo, cuando se realizó la secuenciación masiva, el 30% de los recién nacidos por cesárea y por parto eutócico se pudo detectar material genético bacteriano. Lo que sugiere que la secuenciación masiva es un método que tiene una mayor sensibilidad. También sugiere que el tracto respiratorio en el momento del nacimiento puede estar estéril en el 70% de los recién nacidos. Sin embargo,

una tercera parte si tiene bacterias desde el nacimiento. Si las adquiere en las primeras horas durante su nacimiento o si las adquiere in útero es una pregunta que valdría la pena explorar, debido a que la hipótesis es que el ambiente uterino es estéril.

Las muestras de meconio en los bebés nacidos por vía cesárea presentaron un incremento en Firmicutes vs Bacteroidetes, se ha observado en estudios que el tener una microbiota con predominio de firmicutes en lugar de bacteroidetes, es un factor de riesgo para presentar obesidad y síndrome metabólico. Esto podría estar relacionado ya que los bacteroidetes degradan polisacáridos y carbohidratos y activan el sistema inmunológico. Y este predominio al parecer esta condicionado por un nacimiento por vía cesárea.

Otro hallazgo importante es que en las muestras de meconio se observó un incremento de proteobacterias en parto fisiológico 75% vs 39% en cesárea, esto es de suma importancia, porque uno de los componentes estructurales de las proteobacterias es la endotoxina lipopolisacaridasa, en donde algunos estudios la relacionan con enfermedades metabólicas y a enfermedades autoinmunes, habría que determinar si la alimentación y microbioma materno no eran idóneos al momento de la gestación y esta alteración pudiera desencadenar múltiples trastornos metabólicos e inmunológicos en la etapa adulta.

En las muestras que se tomaron de microbiota nasal no se encontraron grandes diferencias a nivel de Phylum; sin embargo, en el análisis de género mostró una mayor diversidad en los recién nacidos que se obtuvieron por parto fisiológico, dentro de las cuales destaca una mayor proporción de Streptococcus y Staphylococcus, que en los recién nacidos obtenidos por cesárea. Se había reportado que los recién nacidos por cesárea son más susceptibles a enfermedades

por Staphylococcus MSR y puede ser secundario a una menor exposición a las bacterias desde etapa temprana.

Conociendo el microbioma del neonato sano, sin factores de riesgo asociados, nos abre una ventana de oportunidades para crear nuevas soluciones a uno de los problemas de salud más relevantes en México, que es la obesidad y las complicaciones que esta desencadena. Ya que podemos implementar iniciativas para modificar el microbioma materno previo a la concepción, mantenerlo o mejorarlo durante la gestación y durante el nacimiento, de acuerdo con la vía de nacimiento. Inclusive se podría hacer una serie de intervenciones en la etapa neonatal para mejorar el ambiente y el microbioma, para mejorar el estado de salud del hospedero y de esta manera tener impacto en la salud que se tendrá en la etapa adulta y al mismo tiempo sería un impacto en la salud pública a futuro ya que estaríamos previniendo la obesidad y trastornos metabólicos desde la etapa fetal y neonatal.

12. Conclusiones

- En el microbioma nasal no se encontraron diferencias importantes a nivel del *Phylum*, pero el análisis de género mostró una mayor diversidad en el RN por parto vaginal, además de una mayor proporción de *Streptococcus* y *Staphylococcus* en recién nacido por cesárea.
- Existen diferencias en la composición bacteriana en el microbioma intestinal de acuerdo al modo de nacimiento en las primeras horas de vida.
- Existe una mayor cantidad de Proteobacterias en recién nacidos por parto vaginal; y en los RN por cesárea existe una mayor proporción de Firmicutes.
- Los bebés nacidos por cesárea presentan en el meconio bacterias asociadas a la piel como *Staphylococcus* y *Streptococcus* que no se observan en bebés nacidos por parto vaginal en el que predominan las enterobacterias, *Escherichia* y *Shigella* que son bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal materno.

13. Bibliografía:

1. Icaza-Chávez ME. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. Revista de Gastroenterología de México, 2013; 78 (4): 240 – 248
2. Bäckhed et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. Cell Host & Microbe 17, 690 – 703, May 13, 2015
3. S. Esposito, N. Principi. Impact of nasopharyngeal microbiota on the development of respiratory tract diseases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, DOI 10.1007/s10096-017-3076-7
4. Aagaard K et al. Science Trans Med 2014;6:237
5. Gasparini Andrew J, Crofts Terence S, Gibson Molly K, Tarr Phillip I, Warner Barbara B. Antibiotic perturbation of the preterm infant gut microbiome and resistome. Gut Microbes 2016, vol 7, No. 5, 443 – 449
6. Wampach Linda, Heintz-Buschart Anna, Fritz Joëlle V, Ramiro-Garcia Javier et al. Birth mode is associated with earliest strain-conferred gut microbiome functions and immunostimulatory potential. Nature Communications, 2018, 9:5091, DOI: 10.1038/s41467-018-07631-x
7. Dominguez-Bello Maria G, Costello Elizabeth K, Contreras Monica, Magris Magda, Hidalgo Gilda, Fierer Noah, Knighth Rob. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. PNAS, June 29, 2010, vol. 107, no. 26, 11971 – 11975
8. Yatsunencko Tanya, Rey Federico E, et al. Human gut microbiome views across age and geography. Nature, vol 486, 14 june 2012, 222
9. Mulligan Christopher M, Friedman Jacob E. Maternal modifiers of the infant gut microbiota: metabolic consequences. <http://joe.endocrinology-journals.org>, DOI: 10.1530/JOE-17-0303

10. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr Rev.* 2015 Jul;73(7):426-37. DOI: 10.1093/nutrit/nuu016
11. Dzidic Majda, Boix-Amorós Alba, Selma-Royo Marta, Mira Alex, Collado Maria Carmen. Gut Microbiota and Mucosal Immunity in the Neonate. *Med Sci* 2018 Sep;6(3):56. DOI: 10.3390/medsci6030056
12. Gasparini Andrew J, Crofts Terence S., Gibson Molly K, Tarr Phillip I., Warner Barbara B, Dantas Gautam. Antibiotic perturbation of the preterm infant gut microbiome and resistome. *Gut Microbes* 2016, vol 7, no 5, 443-449
13. Dominguez-Bello Maria G, Costello Elizabeth K, Contreras Monica, Magris Magda, Hidalgo Glida, Fierer Noah, Knight Rob. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *PNAS*, June 29,2010, vol. 107, no. 26, 11971 – 11975
14. Serrano Carolina A, León Miguel, Harris Paul R. Desarrollo de la microbiota gastrointestinal en lactantes y su rol en salud y enfermedad. *Revista de Ciencias Médicas*, 2016, vol 41, núm 1.