



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**División de Estudios de Postgrado e Investigación
Instituto De Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores
del Estado**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MICROBIOTA
INTESTINAL DE RECIÉN NACIDOS EUTRÓFICOS A TÉRMINO DEL
HOSPITAL GENERAL LIC ADOLFO LÓPEZ MATEOS.**

Trabajo de investigación que presenta:

DRA. NATALIA ROCIO JIMÉNEZ CUBRIA

Para obtener el diploma de la especialidad

PEDIATRÍA

ASESOR DE TESIS :

DRA. MARTHA EUNICE RODRÍGUEZ ARELLANO

No. Registro de protocolo 148.2016



CIUDAD DE MÉXICO

31 Mayo 2016



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.

DR. ANTONIO RODRIGUEZ ARAIZA
CORDINADOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

DR GUILBALDO PATIÑO CARRANZA
JEFE DE ENSEÑANZA MÉDICA

DRA MARTHA EUNICE RODRIGUEZ ARELLANO
JEFE DE INVESTIGACIÓN

DR BALTAZAR BARRAGAN HERNANDEZ
PROFESOR TITULAR DE PEDIATRIA

DRA. MARTHA EUNICE RODRIGUEZ ARELLANO
ASESOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que me han apoyado en cada paso del camino de mi carrera profesional, que con su amor incondicional siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi profesión y de mi vida; gracias por estar siempre en ella.

A mi profesor titular y mi profesor titular adjunto, gracias por guiarme en este proceso de aprendizaje, siempre preocupándose por mi formación y mi desarrollo; gracias por su generosidad y su apoyo.

A mi asesora por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia, por la disposición y preocupación por mi formación, por la paciencia y generosidad que han hecho posible esta tesis.

ÍNDICE:

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
MARCO TEÓRICO.....	7
JUSTIFICACIÓN	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
RESULTADOS.....	12
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	25
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	26
ANEXOS	31

RESUMEN

La microbiota intestinal, sitio donde coexisten e interactúan elementos bacterianos, sustancias inertes, grupos bacterianos, sustratos digestivos, epitelio de la mucosa y el sistema inmune, ha podido ser caracterizado desde que se descifró el genoma humano a principios de este siglo. Desde entonces, se han desarrollado técnicas para estudiar las secuencias de ácidos nucleicos que permiten el conocimiento de la diversidad bacteriana intestinal. Reportes de investigación han sido publicados tratando de dilucidar las relaciones existentes entre la microbiota intestinal y el riesgo hacia algunas enfermedades o síndromes, existiendo diversas hipótesis donde los paradigmas del conocimiento de este tema, específicamente en este trabajo en la etapa neonatal, tienden revertirse, quedando aún muchas preguntas por responderse acerca de todo el potencial de la microbiota: del cómo y porqué el intestino neonatal se coloniza por determinadas bacterias cuya composición se asume que influye en la salud del infante y futuro adulto. **El objetivo** de este trabajo es caracterizar molecularmente la ecología bacteriana de 30 neonatos a término eutróficos a través de un diseño transversal, con la técnica de Sanger analizando heces fecales en el laboratorio de genómica. **Los resultados** extraídos se evalúan estadísticamente, llegando a conclusiones válidas comparables con reportes descritos de la literatura revisada.

Palabras clave:

Microbiota intestinal, neonato a término eutrófico, caracterización molecular, colonización intestinal temprana, microbioma.

INTRODUCCIÓN

Un ecosistema puede ser definido como un lugar geográfico donde coexisten los constituyentes vivos y los constituyentes inertes. El tubo digestivo responde bien a esta definición pues es un lugar específico y delimitado por su pared, y jamás está vacío. Está abierto por sus extremos, por donde penetran las bacterias (los constituyentes vivos) y los alimentos (los constituyentes inertes).¹

Algunas bacterias forman parte de la flora bacteriana intestinal, que es un órgano activo funcionalmente, desde el punto de vista bioquímico, pasando por el mecánico y además obviamente actuando como barrera protectora ante las agresiones externas de manera tal que su presencia es fundamental. Esta flora intestinal es además de autóctona, endógena, residente, fisiológica y saprófita, capaz de multiplicarse sin producir daño y manteniendo un equilibrio que se asocia a una serie de características beneficiosas para el huésped, en este caso el intestino humano, constituyendo un verdadero cultivo auto regulable¹ y que actúa dinámicamente en diferentes procesos, desde los metabólicos, de respuesta inmune, barrera protectora, síntesis de sustancias activas y fuertemente sobre la eliminación de las sustancias xenobióticas, que son compuestos orgánicos que penetran al intestino de manera persistente provenientes de la contaminación ambiental.²

Esta comunidad bacteriana es diversa densa y compleja. Se ha estimado que el contenido del colon humano contiene $>10^{14}$ bacterias por gramo y en él existen más de 400 especies diferentes.³

El estudio de la diversidad y ecología de las bacterias intestinales se basa en el uso de técnicas clásicas de cultivo, pero las modernas técnicas de ecología molecular, basadas en la comparación de secuencias de ácidos nucleicos (ADN o ARN) permiten tener una caracterización molecular clasificando los microorganismos por medio de comparaciones filogenéticas entre grupos e incluso se pueden realizar predicciones evolutivas.^{4,5}

Por lo que respecta a los infantes, existe controversia cuando se habla de que los fetos sanos están en un medio estéril, actualmente algunos autores han publicado la presencia de bacterias in útero.^{6,7} Los que están a favor de que el feto está libre de bacterias, asumen que este las va a ir adquiriendo desde el momento de su salida por el canal del parto y que la colonización de las áreas donde debe haber bacterias benéficas, se va realizando conforme el recién nacido va tomando contacto con su madre, y con el medio ambiente.⁸

Otros autores insisten en sus artículos sobre la existencia bacteriana in útero, tomando en cuenta placenta y líquido amniótico y cuya presencia inicia la colonización temprana del intestino del infante.¹⁰ Otros más agregan el efecto benéfico de la alimentación al seno materno sobre la adecuada colonización del intestino infantil que se inicia con la succión del calostro y que favorece la presencia de esta flora benéfica intestinal ya mencionada y su importante rol en la regulación del sistema inmunitario.^{11,12}

Mucho se ha investigado, sobre todo recientemente acerca de las características genéticas de este conjunto de bacterias, y su relación con el tipo de alimentación, desde el punto de vista de factores de protección contra enfermedades que se expresan genéticamente como la obesidad y la diabetes mellitus entre otras.^{12,13}

Además también existen ya múltiples reportes sobre los efectos benéficos de los probióticos, que son administrados a determinados pacientes que tienen carencia de cierto tipo de flora bacteriana en especial la intestinal.¹⁴

Los recientes avances en secuenciación génica han permitido la exploración de complejas comunidades bacterianas que colonizan al ser humano. La estabilidad de esta simbiosis se ha visto amenazada por diversos factores: culturales, microbiológicos, ambientales, por lo que el estudio persistente de estas colonias intestinales es de particular interés en nuestro medio, donde existe la probabilidad de que la alteración en el equilibrio de esta simbiosis tenga relación con la presencia de enfermedades cuya prevalencia va en aumento (diabetes y obesidad entre otras).

MARCO TEORICO

MICROBIOTA

Definición de microbiota: Conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios de los cuerpos de los seres vivos pluricelulares como en el humano. Estos microorganismos se encuentran frecuentemente en diversas partes del cuerpo en individuos sanos y está en una relación simbiótica comensal con su huésped ya que también se obtienen ventajas de ellos, tanto como ellos las obtienen del individuo. Ayudan a la digestión de los alimentos, promueven la síntesis de vitaminas, y protegen contra la colonización de microorganismos patógenos.

Como la microbiota está en una relación simbiótica comensal con el huésped, ambos obtienen ventajas uno de otro, esta relación de simbiosis entre microorganismo y hospedero está actualmente volviendo a ser objetivo de estudio ya que en los últimos 15 años se han obtenido conocimientos avanzados acerca del genoma humano y esto ha servido de base para echar a andar técnicas de caracterización molecular con base en el ADN de las bacterias, que antes no existían y por lo tanto nuevas funciones se están descubriendo en la microbiota, en el caso de este trabajo de la intestinal de la etapa neonatal.¹⁶

Importancia pronóstica para enfermedades complejas: El estatus de la microbiota de cualquier parte del cuerpo puede dar idea del empeoramiento de la enfermedad, o bien al contrario: de su mejoría. Las bacterias comensales benéficas pueden ir en aumento progresivo en el caso de un relapso o tendencia a la mejoría de la enfermedad, cuando las bacterias agresivas tienen a disminuir en la microbiota. Por ejemplo: en las enfermedades inflamatorias del colon, las bacterias que se encuentran aumentadas en las fases críticas de la enfermedad son las enterobacterias, fusobacterias y veillonellaceae. En los trastornos como la diabetes, obesidad y síndrome metabólico las bifidobacterias están disminuídas, en cambio, están presentes y tienen a aumentar las firmicutes, cuando se estabilizan estas entidades patológicas la población de la microbiota se invierte: en el caso de los trastornos metabólicos y la obesidad, las bifidobacterias tienden a aumentar progresivamente y las firmicutes a disminuir. Este es el valor diagnóstico y pronóstico de la microbiota.^{15, 16}

En recién nacidos mexicanos existe carencia de estudios científicos acerca de la microbiota, específicamente en el caso que nos ocupa la intestinal, y esto es relevante ya que como se citó anteriormente existe una elevada prevalencia de obesidad infantil, y no solo esto, tenemos elevada prevalencia de niños con síndrome metabólico que pueden llegar a ser los futuros diabéticos. De aquí se desprende la razón de este proyecto de investigación.

JUSTIFICACIÓN

Ya que el tema de la microbiota es de actualidad, a pesar de que ya existen artículos publicados a nivel mundial, estos están realizados en poblaciones poco homogéneas y de difícil adaptación para nuestra población. Por lo que estudiar la microbiota en nuestros recién nacidos derechohabientes permitirá establecer un parámetro de normalidad.

La microbiota intestinal en los recién nacidos a término eutróficos y mestizos es un factor importante en presencia de ciertas enfermedades prevalentes (diabetes mellitus, síndrome metabólico y obesidad entre otras) como se ha descrito anteriormente. Por lo cual el caracterizar a la microbiota de estos niños es muy importante para el avance científico dentro de nuestra especialidad, de nuestro hospital y de nuestro país, iniciando con la etapa 1 de revisión exhaustiva de la bibliografía.

OBJETIVO GENERAL.

Definir la mejor opción en el establecimiento de ruta crítica para caracterización molecular de la modificación de la flora intestinal bacteriana en recién nacidos eutróficos dentro de las primeras 24 horas de vida extrauterina con base en búsqueda bibliográfica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Búsqueda bibliográfica intensiva.
2. Reclutar una muestra representativa.
3. Obtener los datos antropométricos
4. Iniciar la creación de una base de datos con las variables de interés. Se incluirán los antecedentes maternos de importancia así como la vía de resolución del embarazo, así como si el recién nacido es alimentado al seno materno exclusivo, mixto o con fórmula.
5. Estandarizar el medio de recolección de muestra
6. Estandarizar la amplificación por secuenciación

MATERIAL Y MÉTODOS

La primera etapa del proyecto es la revisión exhaustiva de la literatura que sirve de base para la elaboración del plan siguiente que será la realización de la caracterización molecular de la microbiota intestinal de los recién nacidos a términos eutróficos y mestizos de nuestro hospital, que se describe a continuación:

Previa autorización del comité de investigación, se realizó un el protocolo de un estudio clínico prospectivo, observacional, descriptivo y longitudinal, el cual se dividió en cuatro etapas, en el Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos.

La primera etapa busca establecer la mejor opción para la implementación de la caracterización de la microbiota intestinal de pacientes que cumplan los criterios de selección, en el servicio de Pediatría y el Laboratorio de Medicina Genómica.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- 1) Recién nacidos a término, eutróficos, sanos.
- 2) firma de consentimiento informado por parte de la madre, padre o tutor, de las mujeres que acepten que su hijo participe en el estudio.
- 3) Resolución del embarazo en el hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1) Recién nacidos pretérmino.
- 2) Recién nacidos hipotróficos e hipertróficos de acuerdo con graficas del Dr. Jurado García.
- 3) Productos de madres con patología previa o adquirida durante el embarazo.
- 4) Recién nacidos con inestabilidad metabólica.
- 5) Recién nacidos con malformaciones congénitas.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

- 1) Recién nacidos que no cuenten con datos completos tanto de la madre como del producto.
- 2) Recién nacidos que tengan dudosa toma de muestra
- 3) Recién nacidos de parto distócico o con complicaciones durante la extracción del producto durante la cesárea.

DISEÑO:

Para cumplir la primera etapa, se realizó una revisión exhaustiva de la literatura donde se estableció como punto de convergencia de los diferentes artículos, la amplificación de microbiota en recién nacidos.

Posterior a lo anterior, se plantearon las siguientes etapas: realizar en piloto un estudio en el servicio de Pediatría del Hospital. La segunda etapa consistirá en el llenado de sabana con datos correspondientes a antecedentes pre y perinatales, somatometría y vía de nacimiento además de uso de medicamentos antibióticos, para validación (ANEXO 2). La tercera etapa consistirá en establecer la ruta crítica y estandarizar la toma de muestra

de la primera evacuación, consistiendo en la utilización de un hisopo estéril, el cual se colocará en un tubo estéril el cual se enviará al servicio de medicina genómica donde se conservará bajo congelación a menos 4 centígrados, hasta el procesamiento de la misma. A toda paciente que acuda al servicio de tococirugía para la resolución de su embarazo se le invita a participar en el estudio, se le explica que el estudio es de riesgo mínimo sin ningún tipo de intervención. Se ingresa al estudio mediante la firma del consentimiento informado (ANEXO 1). A las voluntarias se les monitoriza hasta el nacimiento del producto.

En el momento de las maniobras de reanimación básica, se realiza la toma de muestra fecal con hisopo estéril se coloca en un tubo estéril y posteriormente se envía la muestra al servicio de medicina genómica donde se conserva bajo congelación a menos 4 centígrados, hasta el procesamiento de la misma.

En la etapa 4: se realizara el procesamiento de las misma, realizando la extracción del ADN en equipo automatizado con perlas magnéticas, y posterior secuenciación del patrón de bacterias presentes en la microbiota del recién nacido en las primeras 24 hrs. de vida extrauterina. El método clásico de terminación de la cadena o método de Sanger necesita una hebra molde de ADN de cadena sencilla, un cebador de ADN, una ADN polimerasa I de E. coli con nucleótidos marcados radiactivamente o mediante fluorescencia y nucleótidos modificados que terminan la elongación de la cadena de ADN. La muestra de ADN se divide en cuatro reacciones de secuenciación separadas que contienen los cuatro desoxinucleótidos estándar (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y una ADN polimerasa. En cada reacción se añade solo uno de los cuatro didesoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP, o ddTTP). Estos didesoxinucleótidos terminan la elongación de la cadena al carecer de un grupo 3'-OH que se necesita para la formación del enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos durante la elongación de la cadena de ADN. La incorporación de un didesoxinucleótido en la nueva cadena de ADN termina su extensión, lo que produce varios fragmentos de ADN de longitud variable. Los didesoxinucleótidos se añaden a concentraciones lo suficientemente bajas como para que produzcan todas las posibilidades de fragmentos de ADN y al mismo tiempo sean suficientes para realizar la secuenciación. Los fragmentos de ADN sintetizados y marcados de nuevo son desnaturalizados por calor y separados por tamaño (con una resolución de un solo nucleótido) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-urea. Cada una de las cuatro reacciones de síntesis se corre en carriles individuales (Carril A, T, G y C) y se visualizan las bandas de ADN mediante autorradiografía o luz ultravioleta (UV), y la secuencia de ADN se puede leer directamente a partir de la placa de rayos X o de la imagen del gel. Secuenciadores capilares. Este sistema separa, detecta y analiza secuencias de ADN marcadas con fluorescencia basándose en el tamaño de la secuencia. Los resultados se dan como cromatogramas que registran los picos de fluorescencia. Las reacciones de secuenciación se efectúan por separado mediante un termociclador.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se presentará el proyecto ante el comité de ética del hospital para su aprobación.

Se seguirán los lineamientos de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con la declaración de Helsinki, Finlandia, de la Asociación Médica Mundial (1964); revisada y enmendada por la 52^a Asamblea General de Edimburgo, Escocia, Octubre 2000, así como los códigos y normas nacionales e internacionales para las buenas prácticas de la investigación. Se

obtendrá el consentimiento informado del padre o tutor del paciente con firma de testigo previa explicación de la técnica a implementar.

Los siguientes son los principios que rigen a la ética en investigación en seres humanos:

Respeto a la Autonomía.

Basados en la información proporcionada al paciente antes del estudio y con la obtención de su autorización bajo consentimiento informado

Beneficencia.

Los resultados obtenidos en este estudio ayudarán a un mejor manejo de la analgesia en el paciente geriátrico.

No maleficencia.

Para realizar este estudio no se pone en riesgo la vida ni la integridad de ningún paciente.

Equidad.

Se realizará el mismo procedimiento que en las pacientes que no participarán en el estudio, sólo se trata de un estudio observacional y se recabarán los datos necesarios, protegiendo la identidad de cada paciente.

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

En este estudio no se utilizarán dispositivos generadores de radiaciones ionizantes y electromagnéticas, isótopos radiactivos, microorganismos patógenos o material biológico que los contengan. No se realizaran otros procedimientos que puedan representar un riesgo para la salud o integridad del paciente.

La bioseguridad es el conjunto de medidas preventivas que tienen como objeto proteger la salud y seguridad personal de los profesionales de salud y pacientes frente a los diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos y mecánicos.

Todas las profesiones llevan implícito un riesgo inherente a la naturaleza misma de la especialidad y al ambiente donde se desenvuelve el técnico, el profesional y el obrero. La medicina como profesión al fin y en ella específicamente, el personal médico y paramédico que laboran en las áreas quirúrgicas y quirófanos no escapan a esta situación y sufren en su organismo una serie de agresiones por parte del medio donde actúan por efecto de los agentes con que trabajan y de las situaciones en que cotidianamente se ven envueltos que producen en ellos una serie de modificaciones.

RESULTADOS

Revisión bibliográfica

Funciones y composición de la microbiota

Las funciones primarias que desempeña la microbiota en el huésped se clasifican en metabólicas, defensivas y tróficas. Los estudios llevados a cabo libres de gérmenes o colonización intestinal controlada proporcionan la mejor evidencia científica sobre la contribución de la microbiota en la fisiología del organismo anfitrión o huésped. Los animales axénicos o libres de gérmenes son cepas de laboratorio, generalmente murinas que crecen y viven en ambientes estériles y por tanto, sin contacto con microorganismos ni colonización microbiana de ningún tipo.¹⁷

Las funciones metabólicas consisten principalmente en la recuperación de energía y nutrientes de los alimentos. Si comparamos los ratones axénicos con los convencionales podemos observar como los primeros presentan menor desarrollo corporal, con órganos más pequeños, a pesar de una mayor ingesta de alimentos. Estos cambios son reversibles al realizar trasplantes de microbiota fecal procedente de ratones convencionales. A nivel humano, es conocido también que la colonización bacteriana nos provee de una serie de rutas metabólicas para la síntesis de componentes nutricionales elementales, incluyendo vitaminas y aminoácidos esenciales, que nuestro organismo no tiene capacidad de sintetizar.^{16, 18}

La microbiota intestinal se compone mayoritariamente de anaerobios estrictos, que se extraen de la fermentación sacarolítica de substratos metabólicos no digeribles, como carbohidratos complejos vegetales. Derivado de esta fermentación se generan ácidos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) que son utilizados directamente por los colonocitos, obteniendo así entre el 60% y el 70 % de sus requerimientos nutricionales de estos productos de fermentación. Los ácidos grasos de cadena corta permiten además la acidificación del medio colónico, impidiendo el crecimiento de patógenos bacterianos.¹⁹

Las funciones defensivas aportadas por la microbiota constituyen el denominado efecto barrera: la presencia de bacterias comensales que ocupan los nichos ecológicos accesibles previene la invasión de elementos microbianos exógenos al ecosistema y evita su potencial infectividad. Otro aspecto del efecto barrera es la prevención de sobre crecimiento de especies comensales con potencial patógeno.¹⁶ Es el caso de *Clostridium difficile*, que es un comensal saludable habitualmente, pero que después del uso de algunos antibióticos que desequilibran la diversidad global de la microbiota, puede adquirir una posición dominante y producir toxinas que alteran la barrera intestinal y generan lesiones a la mucosa.¹⁶

En relación con las funciones tróficas, cabe destacar el papel de la colonización bacteriana como motor fundamental de la inducción del sistema inmunitario adquirido y de sus mecanismos de regulación según se ha venido reconociendo a lo largo de las últimas dos décadas. Los animales criados en condiciones de asepsia estricta muestran atrofia del sistema inmune de las mucosas (folículos linfoides de tamaño pequeño, escasez de linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia) y también del sistema inmune sistémico (ganglios linfáticos de menor tamaño, bajo nivel de inmunoglobulinas). Por

tanto, parece que la microbiota interviene de manera decisiva en el desarrollo y maduración del sistema inmune.^{16, 18}

Sucesión microbiana

En los primeros días de vida extrauterina, los coliformes y los estreptococos dominan la microbiota; los microorganismos anaerobios aparecen tiempo después y los Clostridium y lactobacilos pueden estar presentes por lapsos cortos.

Durante las primeras semanas de alimentación, la sucesión microbiana está condicionada a la exposición a bacterias fecales y ambientales. Los factores externos diversos y los propios del huésped en este caso el infante, condicionan la ingesta de microorganismos y la sucesión de cepas que colonizan el intestino. Así, el desarrollo de la microbiota en los lactantes se ha dividido en cuatro fases:

La primera muy mencionada en nuestro trabajo es la adquisición de la flora intestinal inicial, en las primeras dos semanas de vida.

La segunda es la etapa en la cual se adquieren bacterias tanto a través de la leche materna, como a través del contacto con la madre, es decir, el contacto con su piel, las bacterias de su boca y de tu tracto respiratorio, son secuencias de sucesos que van haciendo evolucionar a la microbiota del lactante.

La tercera etapa principia cuando se inicia la suplementación alimentaria y se inicia la conversión de la microbiota predominantemente si se suspende la leche materna. Después de esta etapa la microbiota establecida es responsable de la creación de un ambiente favorable para géneros bacteroides, Bifidobacterium y Clostridium por un lapso de 4 a 7 días.

La cuarta y última etapa se inicia con la ingesta de los primeros alimentos no lácteos por el infante. Y es en realidad en esta etapa cuando la microbiota puede tornarse progresivamente de ser un factor protector en contra de diversas patologías, ya que aquí intervienen otros factores no considerados anteriormente que son los socioculturales, que interfieren a veces de manera positiva cuando al infante se le ofrece una dieta balanceada y adecuada con su edad, o bien interfiere de manera negativa convirtiéndose en un factor de riesgo para enfermedades tales como la obesidad y la diabetes mellitus. El número de bacteroides y cocos Gram positivos anaerobios aumenta gradualmente durante las fases III y IV.

Además, algunas otras bacterias, como son eubacterias, veillonellas, estafilococos, propionibacterias, bacilos, fusobacterias y levaduras, están presentes en heces de los adultos y pueden estar en las heces de los infantes.¹⁷

Factores que intervienen en la sucesión microbiana

En la sucesión microbiana en el tracto gastrointestinal intervienen diversos factores relacionados con los huéspedes, tanto intrínsecos como extrínsecos.

Los extrínsecos incluyen la carga microbiana del ambiente, de los alimentos, de los hábitos alimenticios y de la composición de la microbiota materna. Además, cabe señalar que la temperatura puede influir en la sucesión de los microorganismos. Los estudios relacionados con los factores externos que influyen en la microbiota de los adultos mencionan que la dieta influye en la composición de las bacterias intestinales. Los antibióticos pueden inducir cambios en la población de bacterias, ya que tienen efecto sobre algunos componentes de la microbiota, como puede ser la supresión no específica de los microorganismos. También se ha estudiado que el perfil de la población bacteriana

que emerge después del tratamiento; los efectos de la terapia con antibióticos pueden persistir.¹⁹

Los factores intrínsecos, como son el pH intestinal, la interacción microbiana, la temperatura ambiental, el proceso digestivo, los ácidos biliares, las secreciones del huésped, la respuesta inmune, la terapia con drogas, los receptores bacterianos de la mucosa, los nutrientes y la microbiota residente, influyen en la sucesión y estabilidad de ésta, y en los cambios en la población bacteria.^{17,19}

Los factores que influyen en la ingesta de microorganismos en recién nacidos y adultos, están condicionados a la dinámica intestinal del hospedero y a los factores ambientales intrínsecos y extrínsecos, pero sobre todo, en los infantes la colonización se favorece por la propia actividad del contacto con diversos objetos.²⁰

La microbiota en los neonatos

Para Domínguez- Bello et al, el feto permanece esencialmente estéril hasta la ruptura del saco amniótico. La microbiota oral, intestinal, vaginal y del tracto urinario materno contribuye a la siembra inicial de la microbiota neonatal. Con el paso a través del canal de parto los recién nacidos son inoculados al nacer (transmisión vertical) y en conjunción con un número variable de exposiciones posteriores (transmisión horizontal), se establecerá la composición de su microbiota inicial que evolucionará en el tiempo, siendo entre los 2 y 3 años indistinguible de una microbiota adulta.²¹

En la evolución de los mamíferos, los cambios o pérdidas potenciales en la transmisión vertical de la microbiota desde la madre su descendencia podría ser compensada a través de la transmisión horizontal (agua potable contaminada con heces, elevado contacto físico, conglomeración social y familias numerosas). Sin embargo, la pérdida progresiva de la microbiota transmitida verticalmente en ausencia de reemplazo horizontal representa un fenómeno acumulativo de cohorte de nacimiento. Los eventos que promueven una disminución en la diversidad y riqueza de la microbiota han sido asociados clásicamente con riesgo de enfermedad. Por lo que es crucial comprender cómo la práctica de la medicina moderna y el estilo de vida occidental afectan el desarrollo y la diversidad de la microbiota. Al menos tres factores claves han sido identificados: elevadas tasas de cesárea, uso de antibióticos y patrones de alimentación.¹⁷

Un ejemplo de lo descrito anteriormente es el estudio de Brandt et al en 2012, en Sao Paulo Brasil, quienes estudiaron las heces fecales de 10 recién nacidos alimentados por seno materno de madres de estrato social bajo en Brasil durante el primer mes de vida extrauterina. Después de examinar las heces a través de métodos de secuenciación de DNA y PRC, encontrando que los grupos filogenéticos fueron *Escherichia* y *Clostridium*, mientras que al estafilococo se le identificó a una velocidad baja. Las bifidobacterias se identificaron en todas las muestras, excepto en la de un niño que recibió antibioticoterapia, en cuyo caso *Escherichia* y *Clostridium* disminuyeron, encontrándose un elevado crecimiento de *Klebisella*. En este estudio de una pequeña cohorte de recién nacidos, se esclarece lo que se ha venido comentando acerca de la colonización vertical entre madre y recién nacido, y de que a pesar de tener un estrato social bajo, la colonización intestinal constituyo una adecuada microbiota de estos infantes, además de

como el manejo con antibióticos altera el equilibrio y el tipo de bacterias que pueden en un momento ser potencialmente patógenas.²³

Se mencionó anteriormente el énfasis de algunos investigadores en asumir que durante la etapa fetal el intestino se encuentra estéril y que durante el nacimiento los neonatos son expuestos a microorganismos de origen materno y del medio externo en que nace, que es cuando ocurre la colonización de su intestino.

Reportes de estudios más recientes han manifestado que el feto no se encuentra en un medio estéril y más aún, que son la placenta, el cordón umbilical y el líquido amniótico los responsables de este primer contacto del feto y su futura microbiota.²⁴

Se sabe que el tipo de parto tiene un efecto significativo en el desarrollo de la microbiota intestinal: un parto normal favorece la adquisición de la flora materna y se reporta el aislamiento de microorganismos viables en el estómago y la boca de los recién nacidos. Serotipos de *Escherichia coli* se encuentran en la boca de los recién nacidos y en las heces fecales de la madre, inmediatamente después del parto. A nivel de nasofaringe, 62% de infantes tienen bacterias que están presentes en la vagina de la madre.²⁵

Por otra parte, los niños nacidos por cesárea pueden estar también expuestos a la microbiota de la madre, en este caso con las bacterias de la piel materna, estando más expuestos al medio ambiente, como el equipo de cirugía, el aire, la presencia de otros recién nacidos así como el personal hospitalario.²⁶

Después del nacimiento, el ambiente, la boca y lesiones cutáneas de la madre pueden servir de mecanismo para transferir las bacterias a los recién nacidos, al amamantarlos, besarlos y acariciarlos. La exposición del neonato a nuevos microorganismos por la leche materna de madres sanas representa, aproximadamente, 109 microorganismos por litro; comúnmente se encuentran estafilococos, corynebacterias, lactobacilos, micrococos y bifidobacterias. Estas bacterias inicialmente se localizan en el pezón y en los conductos lácteos por donde pasa la leche.^{25,26}

Se han descrito 17 grupos de microorganismos que habitan en el tracto genital bajo de las mujeres embarazadas, con los cuales entran en contacto al nacer, los neonatos. *Escherichia coli* y los estreptococos son comúnmente identificados en el tracto digestivo superior, después del nacimiento, y los lactobacilos son numerosos en todo el tracto digestivo y comúnmente se les encuentra en las heces de los lactantes, dichos lactobacilos también se han encontrado presentes en la etapa adulta.²⁷

En la actualidad los infantes están expuestos a diferentes bacterias, dependiendo si se obtienen por parto normal o por operación cesárea, y estos sucesos están íntimamente relacionados con las diferencias de las microbiotas intestinales que poseen, estas diferencias pueden tener influencia sobre la fisiología intestinal y la predisposición a ciertas enfermedades.²⁸

Domínguez –Bello et al en 2010, realizaron la caracterización de la microbiota intestinal de recién nacidos ya sea obtenidos por parto o por cesárea. El objetivo de ellos fue el de tener una perspectiva más amplia acerca de la influencia del modo o vía de nacimiento sobre las características bacterianas de cada una de las microbiotas. Los resultados mostraron que los bebés obtenidos por vía vaginal adquirieron comunidades bacterianas semejantes a las de la microbiota vaginal materna, tales como: *Lacobacillus*, *Prevotella* o *Sneathia spp.*, y que los bebés nacidos por cesárea hospedaron bacterias semejantes a las de la superficie de la piel materna tales como *Staphylococcus*, *Corinebacterium* y

Propionibacterium spp. Estos hallazgos han establecido una base para futuros rastreos de sucesión de microbiota que se puede desarrollar en diferentes partes del cuerpo sirviendo de hábitat para estos microbiomas tomando en cuenta desde luego la vía de obtención del bebé, ya sea parto o cesárea.²¹

Colonización intestinal temprana neonatal

Tras el nacimiento, se inicia la colonización intestinal del neonato, en la que priman los microorganismos anaerobios facultativos, como: enterobacterias y lactobacilos, seguidos por otros anaerobios no facultativos, como bifidobacterium, bacteroides y clostridium.²³

El intestino delgado es rico en enzimas monosacaridasas y disacaridasas esenciales en el desarrollo de serotipos específicos, como proteobacteria y lactobacilos, mientras que en el intestino grueso predominan mucinas y fibras dietéticas no digeribles. Como consecuencia, los bacteroides y clostridium son las bacterias más abundantes de esta región. La disponibilidad de nutrientes modifica la colonización microbiológica y determina su tropismo ulterior.³⁰

La colonización intestinal es un proceso dinámico influido por factores como la edad gestacional del recién nacido, el tipo de parto, la alimentación del neonato y el uso de antibioterapia en la madre o en el niño. Un parto por vía vaginal favorece la adquisición de microorganismos maternos de la región perianal (se han aislado bacterias a nivel de la nasofaringe del neonato, que están presentes en la vagina de la madre); en cambio, cuando el nacimiento se produce a través de cesárea, la exposición a estos microorganismos maternos es mínima.²⁶

Los microorganismos patógenos y comensales requieren nichos ecológicos similares para la colonización y proliferación intestinal. Entre ambos se establecen relaciones de competencia por los micronutrientes, de tal manera, que la abundancia de nutrientes es determinante en el establecimiento de la microbiota intestinal. Bajo condiciones de escasez sobrevive el mejor adaptado. Desafortunadamente los microorganismos patógenos cuentan con mecanismos adaptativos de probada eficiencia, que les permiten burlar las barreras naturales establecidas por la microbiota. Patógenos y comensales compiten por oxígeno, hidratos de carbono, aminoácidos y ácidos grasos.²⁷

Los microorganismos comensales tienen la capacidad de modificar las condiciones del microambiente a través de cambios en el pH, lo cual limita la supervivencia de los patógenos en este medio. También producen toxinas, como proteinasas y bacteriocinas, generadoras de lisis microbiológica de especies similares. Investigaciones microbiológicas han demostrado que la *E. coli* produce bacteriocinas dirigidas a inhibir el crecimiento de la *E. coli* entero hemorrágica, y constituye un importante mecanismo de defensa.³⁰

La microbiota comensal también puede modificar la virulencia de los microorganismos patógenos. Mediante la competencia con el oxígeno y la síntesis de citocinas, como interleucinas (IL) IL-23 e IL-22, inductoras de activación y diferenciación de patrón celular de linfocitos TH 17, estudios recientes demostraron que las citocinas secretadas por los linfocitos TH 17 pueden tener acción dual: pro y antiinflamatoria; 12,13,41 es decir, en un microambiente inflamatorio inducido por la presencia de microorganismos patógenos, las células TH 17 potencian la actividad inflamatoria de macrófagos y polimorfonucleares,

mientras que, en presencia de un predominio de microorganismos comensales, se genera tolerancia inmunitaria. 12,13 Esta acción antagónica expresada por las citocinas secretadas por los linfocitos TH 17, demuestra la complejidad del proceso, y el papel rector del microambiente en el desarrollo de la respuesta inmune de mucosas.¹⁷

El campo de la metagenómica

Microbioma

Conjunto de comunidades microbianas que coloniza un determinado nicho ecológico.²

El “órgano” de La microbiota es el bioreactor central del tracto gastrointestinal. La microbiota está constituida por un número total de 10^{14} . Posee por un contenido genómico o microbioma que representa más de 100 veces el genoma humano. Como se ha estado comentando, la microbiota juega un rol importante en la salud del infante actuando como barrera ante la invasión de patógenos de una manera extremadamente dinámica ejerciendo funciones metabólicas y estimulando al sistema inmune del huésped a través de una serie de procesos bien organizados y programados desde el nacimiento hasta la senectud. El advenimiento de las tecnologías—ómicas”(genómicas, proteómica y la metabolómica), caracterizadas por complejas plataformas tecnológicas y procedimientos analíticos computacionales avanzados, han abiertos nuevos caminos hacia el conocimiento del sistema de microbiota intestinal, clarificando algunos aspectos sobre el establecimiento de comunidades de la microbiota, su constitución, su modulación e interacción con los estímulos externos, la alimentación, así como la variabilidad genética del huésped.⁶

La primera contribución a la génesis del microbioma, como se comentó anteriormente, es la transmisión vertical de la microbiota materna, por colonización de la mucosa del aparato digestivo, respiratorio, urogenital, así como la piel, que comienza tal vez antes del nacimiento, pues antes se creía que el feto in útero estaba estéril.²¹

Metagenoma

Es el genoma colectivo del conjunto de micro-organismos que constituyen una comunidad ecológica. Se ha descrito como la colección de todo el material genético que constituye una comunidad ecológica. La aproximación más común consiste en la extracción del ADN de una muestra biológica, seguido de una amplificación y secuenciación de los genes que codifican para la subunidad 16S del ARN ribosomal. El gen 16S es común para todas las bacterias y contiene regiones constantes y variables, por tanto, las similitudes y diferencias en la secuencia de nucleótidos del gen 16S permiten la caracterización taxonómica precisa de las bacterias que componen una comunidad, pudiendo discernir entre estratos de dominio y phylum hasta nivel de género y especie. La descripción del perfil taxonómico se basa en la comparación de las secuencias de referencia de las bases de datos.³¹

Metagenómica

Es el estudio del material genético de las muestras recuperadas directamente de un nicho ecológico y por tanto obviando la necesidad de aislamiento y cultivo individual de los distintos miembros. Es lo actual para el conocimiento de la composición microbiana de los microbiomas. La aparición de las denominadas técnicas de secuenciación de alto rendimiento, ha supuesto un punto de inflexión en la forma de entender la colonización bacteriana del intestino humano. Antes de la llegada de las citadas técnicas de secuenciación, el estudio de la diversidad bacteriana mediante el cultivo nos aportaba una visión sesgada de la composición bacteriana de la flora fecal, debido al desconocimiento de los requerimientos nutricionales de determinados subgrupos de bacterias y por ende la dificultad de cultivarlos en medios habituales.^{17,19}

La evolución en el campo de la genómica, impulsado en gran medida por el proyecto del Genoma Humano y que ha dado lugar a la metagenómica o la aplicación de técnicas modernas de genómica para el estudio de las comunidades de organismos microbianos directamente en su estado natural. Ha dado como resultado avances significativos en las técnicas de análisis de todo el genoma que ha facilitado en gran medida el estudio del microbioma humano.

Disbiosis

Para hablar de enfermedades, en realidad debemos hablar de este desequilibrio, denominado disbiosis. Existen dos tipos de genomas el humano y el de la microbiota o microbioma, el desbalance entre ambos genomas produciría esta disbiosis, pero esto constituye un trabajo arduo entre los científicos para realizar estudios clínicos y estudios de genomas, en condiciones fisiológicas y patológicas, asignando formas fenotípicas capaces de definir formas enterotípicas humanas especialmente en la infancia y la niñez.²⁹ Para esto, ya existe gran esfuerzo interdisciplinario, incluyendo investigadores clínicos, microbiólogos, especialistas en las disciplinas "ómicas" y los médicos clínicos para esclarecer el rol de la microbiota en los procesos de programación para diferentes enfermedades intestinales, procesos que van desde la simbiosis hasta la disbiosis microbiana a través de un enfoque biológico sistematizado.³³

Metaboloma

Existe una relación fuerte entre la microbiota intestinal y el metabolismo. Esta relación se está convirtiendo en la llave del control energético del intestino, definiéndose el papel de la microbiota en el metabolismo en general denominándose **metaboloma**, que interfiere en las respuestas inmunes y en la génesis de alteraciones metabólicas.³⁴

Existe una interfaz en el epitelio intestinal entre la microbiota y el tejido linfóide, donde la primera juega un papel preponderante en la respuesta inmune, existiendo la capacidad de coexistencia entre ellos durante la vida perinatal en una relación de mutuo beneficio que consiste en dispensar de manera coordinada las respuestas inmunes específicas hacia la biomasa de antígenos extraños y en la discriminación entre las faltas alarmas activadas por antígenos benignos. La pérdida de la homeostasis de este complejo tiene un efecto negativo en la salud intestinal y general. Una vez de que esto sucede se activa una respuesta inflamatoria anormal, como sucede en algunos recién nacidos.³⁶

Existen determinantes para la existencia de determinada microbiota con una densidad y composición necesarias para el mantenimiento eficiente de la función intestinal en el recién nacido.

El ecosistema gastrointestinal se puede representar y considerar como un órgano más (superórgano), que se encuentra dentro del organismo huésped (superorganismo), donde se encuentra una interacción dinámica entre la comida y las células huésped.³⁷

Existe una relación fuerte entre la microbiota intestinal y el metabolismo. Esta relación se está convirtiendo en la llave del control energético del intestino, definiéndose el papel de la microbiota en el metabolismo en general denominándose metaboloma, que interfiere en las respuestas inmunes y en la génesis de alteraciones.^{33,35, 36}

Primeramente el papel de la microbiota en el control de la homeostasis energética del intestino se comprobó a través de ensayos hechos sobre ratones libres de gérmenes, alimentados con una dieta alta en grasas. Mientras que los ratones convencionales ganan peso, los ratones libres de gérmenes continuaron con su estado magro a pesar del aumento diario en la ingesta de alimento. Lo que sugiere un deterioro en la alimentación, el peso aumento cuando los ratones libres de gérmenes fueron colonizados con microbiota de obeso, en lugar de delgado. Lo que sugiere que el tipo de microbiota depende del genoma del huésped. Ha sido demostrado que los ratones obesos tienen un exceso de Firmicutes en comparación con los controles sin grasa y la disbiosis fue invertida bajo circunstancias calóricas. Curiosamente los ratones obesos mostraron tener disbiosis intestinales similares, lo cual es sugerente que pase también en seres humanos. También se demostró que los ratones alimentados con dietas altas en grasas y obesos tenían alteraciones metabólicas, y diabetes en diferentes niveles, lo que sugiere una adaptación metabólica epigenética, no relacionada con el genotipo.³³

Además el tratamiento con antibióticos en los ratones obesos produjo una importante disbiosis que afectó la relación entre Firmicutes y Bacteroides contra proteobacterias.^{35,36}

Las alteraciones de la microbiota se asocian con hiperglicemia, la resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2³⁵

La alimentación en los primeros meses y años de vida es uno de los más importantes determinantes de la salud de los niños que afectan al sistema inmune incluso en la edad adulta.³⁸

El tipo de microbiota puede estar estrechamente relacionado con las alergias, la sensibilización en la primera infancia, y la predisposición metabólica a la obesidad, la diabetes y riesgos cardiovasculares.^{32,37}

La comprensión de la dinámica de las poblaciones de bacterias, será el futuro para tratar las enfermedades y combatir al fenómeno de la resistencia bacteriana.

Para hablar de enfermedades, en realidad debemos hablar de este desequilibrio, denominado disbiosis. Y también debemos considerar dos tipos de genomas el humano y el de la microbiota o microbioma, el desbalance entre ambos genomas produciría esta disbiosis, pero esto constituye un trabajo arduo entre los científicos para realizar estudios clínicos y estudios de genomas, en condiciones fisiológicas y patológicas, asignando

formas fenotípicas capaces de definir formas enterotípicas humanas especialmente en la infancia y la niñez.³³

La leche materna como factor protector de los microbios que colonizan el tracto intestinal neonatal

Las bacterias comensales subyacen en parte gracias al estado nutricional, la función inmunológica y el bienestar psicológico del binomio madre-hijo. Los billones de microbios benéficos de nuestro tracto intestinal como ya se mencionó anteriormente tienen diversas funciones tales como la intervención en proceso de conversión de los nutrientes de la dieta, inhibición de colonización bacteriana patógena, regulación de los procesos inmunes entre otras más. Los avances en el conocimiento de la importancia de los microbios han motivado el desarrollo comercial de productos con buenos comensales benéficos para la salud. Los suplementos probióticos dietéticos contienen microbios in vivo benéficos que colonizan al intestino. Los nutrientes prebióticos mejoran la microflora intestinal al promover la proliferación de microbios benéficos. Para darse una idea de cómo la selección natural ha ido dando forma a la coevolución entre el huésped y los microbios puede encontrarse en la diada madre-hijo de los mamíferos, dado que podemos observar que la leche materna ya está diseñada desde el punto de vista ecológico. De estas ideas nacen los proyectos para el diseño tecnológico de nutrientes específicos para mejorar la salud humana no solo en la infancia sino a lo largo de toda la vida del ser humano.³⁸

El establecimiento y mantenimiento de la comunidad bacteriana del intestino pediátrico varía en función de la exposición a bacterias, su colonización exitosa, y una adecuada nutrición. La exposición perinatal es un factor cuya variación es muy grande dentro de una población o entre diversas poblaciones culturalmente hablando, que puede ir desde el nacimiento por operación cesárea en un hospital de tercer nivel hasta una atención de parto domiciliariamente, por familiares, médicos, pasantes o parteras. De esta manera el paso de microbios al intestino del recién nacido varía desde el medioambiente en que nace: la superficie, las personas y los animales alrededor, etcétera.³⁹

Los microbios destinados a constituir el microbioma intestinal del recién nacido alimentado al seno materno, provienen además de la leche materna, del paso de microbios de la piel de la madre, y el flujo retrogrado entre el pezón y la garganta del recién nacido, incluyendo la teoría de una comunicación directa entre la leche materna y el intestino del recién nacido. Una vez de que la leche se encuentra en el intersticio intestinal del lactante, se inicia una continua e intensa competencia por los nutrientes y el hábitat intestinal entre las bacterias.⁴⁰

La leche materna es una rica fuente de oligosacáridos complejos y de compuestos glicoconjugados y que son la única fuente de carbono para el infante. Se ha hecho investigaciones sobre la estructura de los oligosacáridos de la leche humana, descubriéndose que tienen una mayor diversidad (más de 200 isómeros), mayor complejidad y mayor abundancia que en la leche de otros primates. Dentro de los microbios que se alimentan de estos compuestos está el *Bifidobacterium* una de las cepas más protectoras del intestino del lactante. Este microbio fue descrito desde hace más de 40 años como un miembro de la comunidad intestinal del lactante. Recientemente

se describió que la bacteria tipo lactante *bifidobacteria*, *B longum subsp. Infantis*, tiene genes que codifican proteínas para que unan, escindan, y metabolicen oligosacáridos de la leche humana.⁴¹

Las variaciones en las características y los niveles de oligosacáridos varían se acuerdo con las diferentes poblaciones de mujeres lactando y su medio ambiente, variando así los diferentes tipos o cepas de bifidobacterias. El consumo de oligosacáridos por las bifidobacterias produce ácidos grados de cadena corta como el acetato o el butirato, que crean un pH bajo que es hostil para algunos patógenos. La presencia de las bifidobacterias asociadas con la leche materna fortalece el sistema inmune del lactante contribuyendo a su adecuado desarrollo.^{29,41}

Las bifidobacterias actúan como una especie de barrera en la superficie del epitelio intestinal del infante. En lactantes de Bangladesh la presencia de elevadas cantidades de *B. longum subsp. Infantis*, Mostraron tener una mayor crecimiento del timo con linfocitos maduros, y múltiples indicadores de mejoría de la inmunidad mediada por células. Estos infantes tuvieron mejores células T periféricas, respondiendo mejor a enterotoxinas B y a estafilococos. Y mejores respuestas de células T en respuesta a la vacunación contra polio y tétanos.³¹

Hansen et al en 2015, realizaron un estudio en Inglaterra, donde examinaron la primer salida de meconio del recién nacido para comprobar si el producto ya nacía con cierta población de bacterias que traía desde el útero materno. El estudio demuestra la presencia de bajo número de bacterias en el intestino de recién nacidos a término obtenidos por parto vaginal alimentados con leche materna. El 66 % de los infantes tuvieron evidencia de bacterias con la prueba de FISH. Las bacterias encontradas fueron *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, y *Bacteroides-Prevotella*.⁴²

Lee et al, realizaron un estudio en recién nacidos Coreanos. El objetivo de este estudio fue examinar la microbiota de los recién nacidos procedentes de regiones urbanas. Se incluyeron 128 recién nacidos a término, obtenidos por parto normal en tres hospitales de Corea entre enero del 2009 y febrero del 2010. Las 143 muestras de heces se cultivaron para determinar las cantidades de bacterias totales, anaerobias, bacterias Gram-positivas, coliformes, los lactobacilos y las bifidobacterias. Las muestras se evaluaron con un análisis de correlación entre coliformes y lactobacilos.⁴³

En sus resultados las bacterias se cultivaron en el 61.5% de las heces en el siguiente orden: anaerobios, bacterias Gram-positivas, lactobacilos, coliformes y bifidobacterias. El crecimiento de las bacterias totales y lactobacilos aumentó en las heces después de 24 horas de su nacimiento ($P < 0.001$, $p = 0.008$) y anaerobios disminuyó ($P = 0.003$). Una correlación negativa entre el crecimiento de lactobacilos y bacterias coliformes fue encontrada ($r = -0.463$, $p < 0.001$).

Este estudio confirma que el intestino de los recién nacidos sanos en las ciudades no es estéril, pero que la diversificación bacteriana varía en su etapa temprana y por factores individuales y medioambientales.

Esta evidencia de la colonización temprana del microbioma neonatal tan cercano al nacimiento sugiere que debió haber habido una exposición antenatal a bacterias comensales tales como las de la placenta. Se sabe que a medida que el feto va madurando va deglutiendo líquido amniótico particularmente durante el primer trimestre

de la gestación. Si el medio ambiente intrauterino posee su propia microbiota, se ha sugerido en recientes estudios que esta microbiota intrauterina coloniza al intestino fetal, pues como y se sabe el meconio no es estéril, sino que posee bacterias provenientes de la microbiota intrauterina y placentaria.³⁶

Los bebés nacidos por vía vaginal, como fue comentado anteriormente, tienen en su microbiota gérmenes relacionados con la flora vaginal tales como: *Lactobacillus* and *Prevotella*. Mientras que los nacidos por cesárea, poseen bacterias de la piel de la madre tales como: *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Propionobacterium* y *Corynebacterium* teniendo una deficiencia en anaerobios tales como bacteroides y bifidobacterias.³⁹

Otros autores como, Khodayar-Pardo (2014), Hinde y Lewis (2015), también publican acerca del papel fundamental del tipo de alimentación que reciba el bebé, leche materna o fórmula que influyen en el grado y tipo de colonización que se lleve a cabo en su intestino y del aporte por parte de la microbiota de compuestos que equilibran el metabolismo del recién nacido y del infante y a lo largo de toda su vida hasta llegar a la edad adulta⁴⁴

La microbiota tiene influencia sobre el sistema inmunológico. El bebé nace ya protegido por su madre a través de la inmunidad celular (linfocitos T). Durante y después del nacimiento se inicia la colonización de los microbiomas, sin embargo solo una parte de todos los microbios a los que el bebé está expuesto al nacer, permanecen en estos nichos ecológicos que van cambiando y evolucionando hasta que llega la edad adulta, como lo comentan La Rosa Hernández et al.^{45,46}

Relación entre el tipo de alimentación del infante sobre la caracterización de su microbiota

El papel de la microbiota en el control de la homeostasis energética intestinal se ha comprobado a través de ensayos realizados por Putignani et al en 2014, utilizaron ratas libres de gérmenes, alimentadas con una dieta alta en grasas. Los resultados de estos ensayos fueron ratas cuyo intestino fue colonizado por la microbiota característica de la obesidad, lo que sugiere una relación directa entre una dieta rica en carbohidratos y grasas y el genoma del huésped. Se demostró además que esta microbiota contiene un exceso de *Firmicutes*, bacterias que están involucradas en la patogenia de la obesidad y cuyo crecimiento y proliferación es estimulado por la dieta de baja calidad.³⁸

Estos y otros investigadores han encontrado que estas bacterias activan las vías de inflamación, de resistencia a la insulina y alteran los niveles de lípidos y grasas. Con estos resultados se puede interpretar que a mayor cantidad de *Firmicutes* mayor índice de obesidad, todos estos resultados sugieren la existencia de alteraciones metabólicas importantes en relación con una adaptación metabólica epigenética, no relacionada con el genotipo.^{12,35}

De acuerdo con lo reportado por Putignani et al, las alteraciones de la microbiota se asocian con hiperglicemia, la resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2. Expresando que la alimentación en los primeros meses y años de vida es uno de los más importantes determinantes de la salud de los niños que afectan al sistema inmune incluso

en la edad adulta. El tipo de microbiota puede estar estrechamente relacionado con las alergias, la sensibilización en la primera infancia, y la predisposición metabólica a la obesidad, a la diabetes y riesgos cardiovasculares.

Agregan otros autores que la comprensión de la dinámica de las poblaciones de bacterias, será el futuro para tratar las enfermedades y combatir al fenómeno de la resistencia bacteriana. Y que para hablar de enfermedades, en realidad debemos hablar de este desequilibrio, denominado disbiosis. Refieren además que también debemos considerar dos tipos de genomas el humano y el de la microbiota o microbioma, el desbalance entre ambos genomas produciría esta disbiosis, pero esto constituye un trabajo arduo entre los científicos para realizar estudios clínicos y estudios de genomas, en condiciones fisiológicas y patológicas, asignando formas fenotípicas capaces de definir formas enterotípicas humanas especialmente en la infancia y la niñez.^{38, 4}

DISCUSIÓN

Durante los últimos 15 años, desde que se descifró el genoma humano, los proyectos científicos acerca de la microbiota humana han cobrado auge, debido a que los avances en la genómica han permitido la realización de experimentos en animales de laboratorio, estudios de cohortes en seres humanos, para el caso concreto de este estudio en recién nacidos, cuya microbiota ha sido de gran interés, ya que a partir de ella, de acuerdo con los expertos, su estructura y composición, se van a poder controlar y en última instancia quizá prevenir ciertas entidades patológicas que hasta el momento actual, están teniendo una prevalencia mundialmente preocupante: la obesidad y la diabetes mellitus y las enfermedades inmunes del colon que están siendo prevalentes en algunos países y razas. Además el conocimiento de las características de la microbiota de una población permitirán a los médicos clínicos establecer programas de manejo y de prevención primaria, además de utilizar esta información para el tratamiento oportuno de los trastornos de la alimentación en los niños y sus padecimientos agudos que van desde una simple diarrea, hasta el manejo y control de las enfermedades alérgicas.

Es verdaderamente un tema que tiene mucho que dar en investigación microbiológica y en investigación clínica pediátrica, muchos estudios clínicos y genómicos están por venir. Ya existen muchas publicaciones acerca de la microbiota y su relación con los cambios y desórdenes metabólicos, muchos de ellos realizados en laboratorios de investigación básica, en animales de experimentación, esto debido a la problemática que existe con el asunto de la ética, acerca de la cual existe ya una extensa legislación a nivel mundial. A pesar de ello numerosos trabajos han sido realizados en humanos, en este caso en infantes, con diseños de investigación bien fundamentados y realizados tal manera que no se ha atentado contra la ética. Llama la atención en la lectura de los artículos de cómo es de diversa la bibliografía acerca de la microbiota intestinal en los niños que han sido estudiados en diversas partes del mundo, de lado a lado de los océanos incluyendo niños brasileños y coreanos entre otros, y lo bien planificados que están los diseños, la mayoría de cohortes, estudios longitudinales, donde están usando algunos de los autores ya las nuevas técnicas ómicas para la caracterización molecular

del microbioma. Sin embargo, al darnos cuenta de la ausencia de reportes en niños mexicanos no nos queda más que hacer de este hueco en nuestra investigación clínica y microbiológica un incentivo para la realización de proyectos, que inicialmente serán probablemente sencillos, pero que servirán de base para que las nuevas generaciones sigan con ésta línea de investigación.

La realización de este proyecto en neonatos eutróficos a término y además mestizos encuentra gran relevancia en esta ausencia de información acerca de la microbiota de nuestras poblaciones pediátricas, primordialmente en nuestro hospital donde se concentra gran parte de las principales entidades patológicas que se derivan de la pérdida de la homeostasis del microbioma intestinal.

CONCLUSIONES

1.-La microbiota se define como el conjunto de microorganismos encontrados en diversos nichos del cuerpo humano y que está en relación simbiótica con él.

2.-Los billones de bacterias benéficas del intestino humano tienen diversas funciones entre otras: metabólicas, de barrera, inhibición de colonización bacteriana y regulación de los procesos inmunes.

3.-El establecimiento y mantenimiento de la microbiota intestinal del intestino del recién nacido y del lactante, varía en función de la exposición a bacterias, su colonización exitosa y una adecuada nutrición.

4.- La exposición perinatal depende esencialmente de la vía de nacimiento, y el tipo y la cantidad de exposición a bacterias, el medio ambiente en el que nace entre otros factores.

5.- El órgano de la microbiota, está constituido por un contenido genómico que es el microbioma, que representa 100 veces el genoma humano.

6.-En el epitelio intestinal perinatal, existe una interfaz entre la microbiota y el tejido linfoide, donde la primera juega un rol preponderante en la respuesta inmune, existiendo la capacidad de coexistencia entre ellos en una relación de mutuo beneficio, que consisten en dispensar de manera coordinada las respuestas inmunes específicas hacia antígenos extraños.

7.-Existe una relación fuerte entre la microbiota intestinal y el metabolismo. La relación tiene la llave del control energético del intestino, en este caso a la microbiota se le llama metaboloma.

8.- La alteración o pérdida de la homeostasis de la microbiota se llama Disbiosis, que se asocia a diversas entidades patológicas entre otras la diabetes mellitus y la obesidad.

9.-La comprensión de la dinámica de las poblaciones bacterianas será el futuro para el tratamiento de las enfermedades y el combate del fenómeno de la resistencia bacteriana.

10.-El trabajo interdisciplinario entre microbiólogos y científicos-ómicos, se encuentra en la interface entre los clínicos y los investigadores, dando luz acerca del papel de la microbiota intestinal del recién nacido, La habilidad que resulte de esta combinación interdisciplinaria constituirá el elemento activo del control del microbioma en el futuro de la medicina.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Morales P, Brignardello J, Goteland M. La microbiota intestinal: un nuevo actor en el desarrollo de la obesidad. *Rev med Chile*. 2010; 138(8):1-4.
2. Robles V, Guarner F. Progreso n el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutr Hosp*. 2013; 28(3):553-557.
3. Khana S, Tosh P. El microbioma humano. *Mayo Clin Proc*. 2014; 89 (1): 1-14.
4. Gevers D et al. The human microbiome Proyect: A comunitiy Resource for the Healthy Human Microbiome. *PLos Biology*, 2012; 10(8): e1001377
5. Serrano C, Harris P. Desarrollo de la microbiota gastrointestinal en lactantes y su rol en salud y enfermedad. *Revista de Ciencias Médicas*. 2016; 4(1):1-9
6. Palmer C, DiGuilio D, Relman D et al. Development of the Human Infant Intestinal Micronbiota. *PLos Biology*. 2007; 6(7):1-23
7. Indrio F et al. Microbiota in healthy term infant. *Early Human Development*. 2013; 89; S: 15-S17.
8. Endo A et al. Long term monitoring of the human intestinal microbiota from the 2nd week to 13 years of age. *Anaerobe*. 2014; 28:149-156.
9. Lindberg E, Norweouzian F et al. Long-time persistence of superantigen-producing staphylococcus aureus strains in the intestinal microflora of healthy infants. *Pediatrics* 2000; 48 (6): 741-747.
10. Dong X, Li X, et al. Bacterial communities in neonatal feces are similar to mother's placentae. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2015; 26 (2): 90-94.
11. Satokari R, Vaughan E et al. Diversity of bifidobacterium and Lactobacillus spp. In breast-fed and formula-fed infants as assessed by 16S rDNA Sequence Differences. *Microb Ecol Health Dis*. 2002; 14(2): 97-105.

12. Donovan S et al. Host-microbe interactions in the neonatal intestine: Role of human milk oligosaccharides. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 2012; 3(3): 450S-455S.
13. Wall R, et al. Role of gut microbiota in early infant development. *Clin Med Pediatr*.2009; 3:44-45.
14. Al-Asmakh MZadjali F. Use of Germ-Free Animal Models in Microbiota-Related Research. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015; 25(10):1583-1588.
15. Del Chierico F, Vernocchi P, Petrucca A, Paci P, Fuentes S, Praticò G et al. Phylogenetic and Metabolic Tracking of Gut Microbiota during Perinatal Development. *PLOS ONE*. 2015 10(9):e0137347.
16. Delgado S. Microbiota intestinal Humana: Analisis y evolución de poblaciones representativas de identificación de Bacterias probióticas. [Doctorado en Microbiología]. Universidad de Oviedo pp1-153; 2005.
17. Robles VGarner F. Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutr Hosp*. 2013; 28(3):553-557.
18. La Rosa Hernandez D, Gomez Cabeza E, Sanchez Castañeda N. La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune del recién nacido. *Rev Cubana Pediatr*. 2016; 86(4):1-3.
19. Gritz EBhandari V. The Human Neonatal Gut Microbiome: A Brief Review. *Frontiers in Pediatrics*. 2015; 3: 1-5.
20. Pärtty Alsolauri E. Gut microbiota and infant distress – the association between compositional development of the gut microbiota and fussing and crying in early infancy. *Microbial Ecology in Health & Disease*. 2012; 23(0).1-4
21. Dominguez-Bello M, Costello E, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107(26):11971-11975.
22. DiGiulio D. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2012; 17(1):2-11.

23. Brandt K, Taddei C, Takagi E, Olivera F, Duarte R. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. *Clinics*. 2012; 67(2):113-123.
24. DiGiulio D, Romero R, Kusanovic J, Gómez R, Kim C, Seok K et al. Prevalence and Diversity of Microbes in the Amniotic Fluid, the Fetal Inflammatory Response, and Pregnancy Outcome in Women with Preterm Pre-Labor Rupture of Membranes. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010:11-23.
25. Makino H, Kushiro A, Ishikawa E, Kubota H, Gawad A, Sakai T et al. Mother-to-Infant Transmission of Intestinal Bifidobacterial Strains Has an Impact on the Early Development of Vaginally Delivered Infant's Microbiota. *PLoS ONE*. 2013; 8(11):e78331.
26. Rigon G, Vallone C, Lucantoni V, Signore F. Maternal Factors Pre- and During Delivery Contribute to Gut Microbiota Shaping in Newborns. *Front Cell Inf Microbio*. 2012:1-13.
27. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica*. 2007; 92:48-55.
28. DiGiulio D, Romero R, Amogan H, Kusanovic J, Bik E, Gotsch F et al. Microbial Prevalence, Diversity and Abundance in Amniotic Fluid During Preterm Labor: A Molecular and Culture-Based Investigation. *PLoS ONE*. 2008; 3(8):112-133.
29. Karlsson C, Molin G, Cilio C, Ahrné S. The Pioneer Gut Microbiota in Human Neonates Vaginally Born at Term— a Pilot Study. *Pediatr Res*. 2011; 70(3):282-286.
30. Mitsou E, Kirtzalidou E, Oikonomou I, Liosis G, Kyriacou A. Fecal microflora of Greek healthy neonates. *Anaerobe*. 2008; 14(2):94-101.
31. Hinde K, Lewis Z. Mother's littlest helpers. *Science*. 2015; 348(6242):1427-1428.
32. Neu J. Delivery mode shapes. The acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Yearbook of Neonatal and Perinatal Medicine*. 2011: 198-200.
33. Larsen P, Dai Y. Metabolome of human gut microbiome is predictive of host dysbiosis. *GigaScience*. 2015; 4(1): 1-5.

34. Mejía-León MBarca A. Diet, Microbiota and Immune System in Type 1 Diabetes Development and Evolution. *Nutrients*. 2015; 7(11):9171-9184.
35. Dogra S, Sakwinska O, Soh S, Ngom-Bru C, Brück W, Berger B et al. Dynamics of Infant Gut Microbiota Are Influenced by Delivery Mode and Gestational Duration and Are Associated with Subsequent Adiposity. *mBio*. 2015; 6(1):e02419-14.
36. Koleva PT. Review. Microbial Programming of Health and Disease Starts during Fetal Life. *Birth Defects Research (part C)*. 2015; 105: 265-277.
- 37.-Rivera-Tapia JA. Ecología Microbiana del tracto Digestivo en la etapa neonatal. *Revista Mexicana de Pediatría*. 2002; 68(6): 257-260.
38. Putignani L, Del Chierco F et al. The Human gut microbiota: a dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Ped Res* 2014; 76(1):2-10.
39. Gregory K, LaPlante R, Shan G, Kumar D, Gregas M. Mode of Birth Influences Preterm Infant Intestinal Colonization With *Bacteroides* Over the Early Neonatal Period. *Advances in Neonatal Care*. 2015; 15(6):386-393.
40. Harmsen H, Wildeboer-Veloo A, Raangs G, Wagendorp A, Klijn N, Bindels J et al. Analysis of Intestinal Flora Development in Breast-Fed and Formula-Fed Infants by Using Molecular Identification and Detection Methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2000; 30(1):61-67.
41. Zhang L, Ming L, Miao J. Colonization and development of intestinal bifidobacterium in early infancy. *Chinese journal of Contemporary Pediatrics*. 2015; 17(3):207-212.
42. Hansen R, Scott K, Khan S, Martin J, Berry S, Stevenson M et al. First-Pass Meconium Samples from Healthy Term Vaginally-Delivered Neonates: An Analysis of the Microbiota. *PLOS ONE*. 2015; 10(7):e0133320.
43. Lee E et al. The early intestinal microbiota of healthy Korean newborns. *Iranian Journal of Pediatrics* 2015; 25(5): 1-5.
44. Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado M, Martínez-Costa C. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *J Perinatol*. 2014; 34(8):599-605.

45. La Rosa-Hernandez D. Gómez-Cabeza E J.Sanchez-Castañeda N. La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema Inmune del recién nacido. Rev. Cuv Pediatr. 2014; 86(4):1-3.
46. Houghteling PWalker W. Why Is Initial Bacterial Colonization of the Intestine Important to Infants' and Children's Health? Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2015; 60(3):294-307.
47. Delzenne NSinger P. Gut microbiota and nutrition: Where are we now? Clinical Nutrition Experimental. 2016; 6:1-2.

ANEXOS

ANEXO 1

CARTA CONCENTIMIENTO INFORMADO

Para participar en el Proyecto de Investigación titulado: Caracterización molecular de bacterias intestinales en recién nacidos a término eutróficos del Hospital Regional Adolfo López Mateos.

Lugar y Fecha.- -----

Por medio de la presente Acepto la Invitación de Participar en el Proyecto de Investigación. Mi participación consistirá en contestar unas preguntas acerca de mi persona y en especial sobre mi embarazo hasta llegar al servicio de tocoquirúrgica, así como permitir que a mi bebé se le realice un estudio de su primera evacuación fecal.

He tenido tiempo para hacer preguntas que se me han contestado amablemente no tengo ninguna duda en la participación.

Acepto voluntariamente participar en el proyecto.

Nombre y firma del Paciente

Nombre y firma del Testigo

ANEXO 2 hoja 1HOJA DE RECOLECCION DE
DATOSCARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE LA
MIOCRIBIOTA EN RECIÉN
NACIDOS EUTROFICOS A
TERMINOFOLIO: FECHA: **DATOS DE IDENTIFICACION DE LA MADRE**NOMBRE: EDAD: AÑOS

IDENTIFICACION _____

DOMICILIO ACTUAL DE LA MADRE

CALLE

NÚMERO

COLONIA

C.P.

ENTRE QUE CALLES: TEL.

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS _____

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLOGICOS _____

FECHA DE ÚLTIMA MENSTRUACION _____

SEMANAS DE GESTACION _____

INCREMENTO PONDERAL MATERNO _____ KILOGRAMOS

INGESTA DE ANTIBIOTICOS DURANTE EL EMBARAZO

SI

NO

INGESTA DE ANTIBIOTICOS DURANTE EL TRABAJO DE
PARTO

SI

NO

INGESTA DE ANTIBIOTICOS EN EL POSTPARTO
INMEDIATO

SI

NO

CONSUMO DE ACIDO FOLICO

SI

NO

CONSUMO DE HIERRO

SI

NO

DATOS DEL RECIEN NACIDO

EDAD _____ HORAS DE VIDA EXTRAUTERINA

SEXO:

MASCULINO

FEMENINO

VIA DE NACIMIENTO:

PARTO

CESAREA

ANEXO 2 HOJA 3

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS:
 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MIOCRIOTA EN RECIÉN NACIDOS

HORAS EN TRABAJO DE PARTO _____

PESO DEL PRODUCTO _____ GRAMOS

TALLA DEL PRODUCTO _____ CENTIMETTROS

PERIMETRO CEFALICO _____ CENTIMETROS

PERIMETRO ABDOMINAL _____ CENTIMETROS

EVALUACIÓN PUNTAJE APGAR

	2	1	0
FRECUENCIA CARDIACA _____			
ESFUERZO RESPIRATORIO _____			
TONO MUSCULAR _____			

IRRITABILIDAD

REFLEJA _____

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA
MIOCRIOT EN RECIÉN NACIDOS

COLOR _____ TOTAL
PUNTAJE _____

EVALUACIÓN ESCALA CAPURRO

FORMA DEL PEZÓN _____

TEXTURA DE LA PIEL _____

FORMA DE LA OREJA _____

TAMAÑO DEL TEJIDO MAMARIO _____

PLIEGUES PLANTARES _____ TOTAL _____

TOMA DE LA MUESTRA

INTERVALO DE TIEMPO ENTRE EL NACIMIENTO Y LA TOMA DE LA MUESTRA _____ MINUTOS,
HORAS.

INTERVALO DE TIEPO ENTRE LA TOMA DE LA MUESTRA Y LA ENTREGA AL

LABORATORIO _____ MINUTOS,
HORAS.

ADECUADA TOMA DE LA MUESTRA

SI

NO

ANEXO 2 HOJA 4

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA
MIOCRIOT EN RECIÉN NACIDOS

RESULTADOS DE LABORATORIO**ANALISIS DE LA MICROBIOTA**

BACTERIAS ENCONTRADAS:
CLASIFICACIÓN:

NUMERO:

ANAEROBIOS		
BACTEROIDES		
BIFIDOBACTERIAS		
CLOSTRIDIA		
EUBACTERIA		
FUSOBACTERIA		
VEILONELLA		