



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ANÁLISIS DEL EFECTO DEL
TRATAMIENTO CON ANTIBIÓTICOS
EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DE
LACTANTES PREMATUROS MEDIANTE
SECUENCIACIÓN DEL GEN ARN_r 16S**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOQUÍMICA
DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A

OSCAR ISMAEL OLIVERA VERGARA

**ASESORA: DRA. GABRIELA GONZÁLEZ PÉREZ
COASESORA: DRA. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**



**UNAM
CUAUTITLÁN**

**DEPARTAMENTO
DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional**

Análisis del efecto del tratamiento con antibióticos en la microbiota intestinal de lactantes prematuros mediante secuenciación del gen ARNr 16S".

Que presenta el pasante: **Oscar Ismael Olivera Vergara**

Con número de cuenta: 314211277 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Agosto de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil	
VOCAL	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	LBD. Luis Javier Morelia Mandujano	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*

Reconocimiento

Este trabajo fue desarrollado en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer-IER) en el Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular bajo la dirección de la Dra. Gabriela González Pérez. El trabajo forma parte del proyecto "Desenlaces clínicos en la etapa infantil asociados con cambios en el microbioma intestinal y la función inmune originados por la administración neonatal de antibióticos" evaluado y aprobado por los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad del INPer-IER, y financiado por el INPer-IER (2017-2-61) y el CONAHCYT (FOSISS SALUD-2017-2-289734).

“No olvides que lo que llamamos hoy realidad fue imaginación ayer...”
José Saramago.

*Dedicado a mis papás, a mis hermanos,
a el amor de mi vida Jaqui
y a Daphne*

Agradecimientos

A mis padres por todo su apoyo incondicional, por todo lo que me han enseñado, que con amor y perseverancia puedo alcanzar las metas que me proponga, este logro es de ustedes. Los admiro mucho a ambos, por su perseverancia y su disciplina con nosotros, que siempre el que mis hermanos y yo estudiemos fue su meta principal y lo han logrado, por su determinación, su honestidad y de además ser siempre mis amigos, de animarme, de platicar conmigo y de siempre escuchar mis pensamientos. Gracias por siempre mirarme con admiración, me hacen sentir muy valioso, espero poder algún día llenarles tanto de orgullo como ustedes me hacen sentir muy orgulloso de que sean mis padres, infinitas gracias.

A mi amada esposa Jaque, la que ha decidido compartir su vida junto a la mía, gracias por siempre estar conmigo, por motivarme cuando mis fuerzas se agotaban, por siempre creer en mí e impulsarme a que sea mejor cada día, por todo el amor dado, las risas incontables, por ser mi fuente de admiración y por darme el mayor regalo que me han dado, a mi pequeña bebé Daphne Elizabeth, a mi pedacito de cielo, mi nuevo motivo de ser mejor.

A mis hermanos Omar y Dulce, gracias por siempre acompañarme, por confiar en mí, por hacer de esta vida más amena y por ser mis cómplices de juego en la infancia y en la juventud, los quiero mucho, siempre tendrán un lugar importante en mi corazón.

A mi tía Lety y a mi tío Miguel por apoyarme cuando más lo necesite y nunca dejar de hacerlo, por cuidarme y recibirme en su casa como si fuera un hijo más. Gracias a mis primos Jessica y Moisés que siempre estuvieron conmigo, me incluyeron en sus planes y me hicieron sentir más en casa.

A mis fieles amigos caninos que me acompañaron durante toda mi formación, que me acompañaban en los desvelos recurrentes, a Luni, Yuli, Cookie, Jaina, Oddy, Chiquito, coronel Coco, Chiquita y a mi gatita Limón. A los que han partido los extrañaré mucho y siempre los llevaré en mi corazón.

A mis amigos de la Facultad: Yef, Marlen, Eder, Laura, Eva, gracias por las pláticas en los pastos, por las comidas juntos, por muchas horas de diversión, por estresarnos juntos por los reportes de laboratorio, y por todas las aventuras que experimentamos en nuestra facultad.

A mis amigos del laboratorio a la M en C. Armida, a la Méd. Jimena y al L.B.M Ángel que con ustedes el estar en el INPer siempre fue más divertido, me enseñaron muchas cosas tanto académicas como de la vida misma, les agradezco sus palabras de aliento, de animarme y de crecer juntos, siempre atesoraré haberlos conocido.

A la Dra. Gabriela González Pérez, gracias por la confianza, la tutoría y la motivación para participar en el proyecto, así como el ayudarme a desarrollar mis habilidades como científico. Gracias por la calidez, el apoyo y por todas las enseñanzas.

A la Dra. Maritere Domínguez Rojas por la asesoría, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por motivarme en el área de la genética molecular, por sus maravillosas clases. Gracias a todos los sinodales por su tiempo que revisaron este trabajo.

A la UNAM y las FESC por mostrarme el mundo de la ciencia y por enseñarme que el conocimiento debe ser para todos y que solo basta un poco de curiosidad para poder aprender.

Tabla de contenido

Índice de tablas.....	X
Índice de figuras.....	X
Abreviaturas.....	XI
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Marco teórico	4
3.1.Microbiota humana.....	4
3.1.1. Microbiota de la piel	4
3.1.2. Microbiota de la leche humana	5
3.1.3. Microbiota de la boca.....	5
3.1.4. Microbiota vaginal	6
3.1.5. Microbiota intestinal	6
3.2.Composición de la MI.....	6
3.3.Funciones de la MI	8
3.3.1. Metabolismo y MI.....	8
3.3.2. Interacción hormonal.....	9
3.3.3. Funciones inmunológicas.....	9
3.4.Prebióticos.....	10
3.5.Probióticos y su administración	11
3.6.Neonatos prematuros	13
3.6.1. Sepsis temprana, sepsis tardía y choque séptico.....	13
3.6.2. Enterocolitis necrosante.....	14
3.7.Inicio de la colonización	14
3.8.Factores que modulan el establecimiento de la microbiota intestinal infantil.	15
3.9.Administración de antibióticos neonatales en el INPer-IER.....	17
3.9.1. Características de los antibióticos neonatales usados en el INPER-IER17	
3.10. Caracterización de la MI.....	19
3.10.1. PCR	19
3.10.2. Secuenciación del ARN ribosomal 16S	20
4. Justificación.....	24
5. Pregunta de investigación	25
6. Hipótesis	26
7. Objetivo general	27

7.1. Objetivos específicos	27
8. Diagrama Experimental	28
9. Materiales.....	29
10. Metodología	30
10.1. Estudio de población y diseño del estudio.....	30
10.2. Datos maternos y de lactantes prematuros	30
10.3. Prácticas de alimentación.	31
10.4. Muestras de heces.....	31
10.5. Extracción de ADN en las muestras de heces.....	32
10.6. Cuantificación de ADN.....	33
10.7. PCR punto final para oligonucleótidos V3-V4.....	33
10.8. Purificación de amplicón V3-V4 de ARNr 16S.....	34
10.9. Electroforesis en gel de agarosa al 2%	35
10.10. Estandarización de método	35
10.11. Cuantificación de microbiota intestinal mediante secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S ribosomal.	38
10.12. Análisis Bioinformático	39
10.13. Análisis estadístico	39
11. Resultados	41
12. Discusión.....	56
13. Conclusiones.....	62
14. Referencias	63

Índice de tablas

Tabla 1. Esquemas de antibióticos neonatales usados en el INPer-IER.....	17
Tabla 2. Oligonucleótidos dirigidos a ARNr 16S	33
Tabla 3. Condiciones de PCR punto final empleadas para el equipo	34
Tabla 4. Estandarización de la amplificación del 16S ARNr V3-V4	37
Tabla 5. Datos demográficos, antropométricos y clínicos de los grupos de estudio.	43

Índice de figuras

Figura 1. Microbiota humana desde el inicio y su configuración a través de las etapas de la vida y sus perturbaciones	7
Figura 2. Microbiota y ácido butírico	8
Figura 3. Prebióticos y Probióticos en Leche humana	12
Figura 4. Temperatura vs tiempo. PCR Reacción en cadena de la polimerasa en termociclador	20
Figura 5. Productos de PCR estandarización	38
Figura 6. Productos de PCR de muestras de heces infantiles	45
Figura 7. Composición taxonómica a nivel de filo	47
Figura 8. Composición taxonómica a nivel de familia	48
Figura 9. Composición taxonómica a nivel de género	50
Figura 10. Análisis de diversidad α por Chao1	51
Figura 11. Análisis de diversidad α por Shannon.....	51
Figura 12. Análisis de diversidad α por Simpson.....	52
Figura 13. Análisis de diversidad β	53
Figura 14. LDA score	54
Figura 15. Diversidad α a través del tiempo	55

Abreviaturas

- AGCC: Ácidos grasos de cadena corta.
- ASV: Variante de secuenciación de amplicones
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal
- dNTPS: Desoxirribonucleótidos trifosfato
- ECN: Enterocolitis necrosante
- EOS: Sepsis neonatal temprana, del inglés early-onset sepsis
- EPO: Eritropoyetina
- F: fórmula láctea
- HIV: Hemorragia intraventricular
- HMOs: oligosacáridos de la leche humana, del inglés human milk oligosaccharides
- IgA: Inmunoglobulina A
- IgE: Inmunoglobulina E
- IgG: Inmunoglobulina G
- ISAPP: Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos, del inglés International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics
- INPer-IER: Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes
- LH: Leche Humana
- LHF: Leche Humana + fórmula
- LOS: sepsis neonatal tardía, del inglés late-onset sepsis
- MI: Microbiota Intestinal
- MO: Microorganismos
- NTC: Control de no templado
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PC: Perímetro cefálico
- QIIME 2: Conocimientos cuantitativos sobre la ecología microbiana 2
- RN: Recién nacido
- SDG: Semanas de gestación
- UFC: Unidades formadoras de colonia
- UCIN: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales
- UCIREN: Unidad de Cuidados Intermedios al Recién Nacido

1. Resumen

La microbiota intestinal es extremadamente compleja, abundante y variada, su interacción con las células humanas es simbiótica y mutualista desempeñando un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y la regulación del sistema inmunológico. Los neonatos prematuros presentan un sistema inmunológico inmaduro y son especialmente vulnerables a las infecciones bacterianas, lo que requiere el uso de antibióticos. Sin embargo, estos medicamentos pueden provocar alteraciones en la abundancia y composición de la microbiota intestinal, generar disbiosis intestinal y favorecer el establecimiento de bacterias patógenas.

Para determinar el efecto del tratamiento con antibióticos sobre la colonización bacteriana intestinal en lactantes prematuros, se analizaron 19 muestras de heces de 3 lactantes sin tratamiento con antibióticos durante el periodo neonatal, 35 muestras de 7 lactantes que recibieron 3 a 7 días antibióticos, y 26 muestras de 7 lactantes recibieron ≥ 8 días de antibióticos. Se extrajo el ADN de las heces, se amplificó la región V3-V4 del gen ARNr 16S, se purificaron los amplicones y se secuenciaron en la plataforma Illumina MiSeq. Posteriormente, se utilizó el programa QIIME 2 para realizar el análisis taxonómico y definir los filos, familias y géneros bacterianos, el análisis de diversidad α y β para determinar las diferencias intra- e inter-grupo, y el análisis LEfSe para identificar las diferencias específicas entre los grupos.

La diversidad α incrementó en todos los grupos conforme aumentó la edad de los lactantes. La diversidad β fue diferente entre los grupos y el análisis de LEfSe reveló las diferencias de bacterias entre grupos a edades específicas. Nuestros resultados sugieren una asociación entre el uso prolongado de antibióticos en lactantes prematuros con una reducción en la abundancia de *Bifidobacterium* y un aumento en la abundancia de *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Haemophilus* y *Veillonella* con respecto a los lactantes que no recibieron antibióticos.

2. Introducción

La conexión entre los seres humanos y los microorganismos que los rodean es íntima. La microbiota se refiere a los microorganismos vivos que habitan en un entorno ecológico específico, está conformada por bacterias, virus, levaduras y parásitos. La microbiota que se encuentra en el sistema gastrointestinal, también denominada microbiota intestinal, es la más compleja, numerosa y diversa. Ésta tiene un comportamiento simbiótico y mutualista con las células eucariotas humanas donde ayuda a la homeostasis, regula el sistema inmune y está estrechamente relacionada con el metabolismo en diversos estados patológicos [1]. En las regiones distales del sistema gastrointestinal, específicamente el colon, se encuentra el reservorio más grande de microorganismos que se sabe influyen en el desarrollo del sistema inmunológico y nervioso entérico, el metabolismo de nutrientes e interacciones con agentes infecciosos [2].

Al nacimiento, el sistema inmune se encuentra inmaduro y su interacción con la microbiota intestinal le permite ejercer actividades inmunomoduladoras. Las células inmunitarias neonatales desarrollan preferentemente tolerancia en respuesta a la exposición al antígeno, ya que propician un ambiente antiinflamatorio, aprendiendo a tolerar el nuevo entorno como la microbiota comensal [2]. Los neonatos prematuros, debido a su inmadurez, son altamente susceptibles a las infecciones bacterianas, por lo que es necesario administrarles antibióticos. Sin embargo, aunque los antibióticos eliminan a las bacterias patógenas, también afectan a las bacterias comensales y mutualistas, provocando un desbalance en la microbiota intestinal denominado disbiosis intestinal que se define como un cambio en la microbiota que difiere del estado normal o saludable [3].

Diversos estudios establecen las consecuencias negativas a corto y largo plazo de la perturbación del desarrollo de la microbiota intestinal en etapas tempranas de la vida. Se ha reportado que la microbiota intestinal de neonatos con enterocolitis necrosante presenta mayor abundancia de los géneros *Clostridium* y *Enterobacteriaceae* [4], [5]. La disbiosis intestinal puede conducir a la aparición y el desarrollo de enfermedades sistémicas como los trastornos del espectro autista [6], el trastorno de déficit de atención e hiperactividad [7], el asma y las alergias [8], la obesidad [9], los trastornos autoinmunitarios [10] y la enterocolitis necrosante [11].

Estos estudios se han llevado a cabo gracias a los avances en las técnicas de microbiología molecular, la bioinformática y las plataformas de secuenciación que permiten obtener conocimientos sobre la composición, la dinámica y el impacto de la microbiota en la salud y la enfermedad [12].

3. Marco teórico

3.1. Microbiota humana

La microbiota se define como una comunidad de microorganismos vivos agrupados en un nicho ecológico determinado. Por otro lado, el microbioma se define como el conjunto formado por los microorganismos (MO), sus genes y los metabolitos que producen en un nicho ecológico establecido. El ser humano es habitado por estos MO y ha evolucionado junto con estas poblaciones. Se estima que la microbiota humana se conforma por cien trillones de MO, superando 10 veces el número de células humanas, representa del 1 al 3 por ciento del peso total del individuo, y está formada por al menos 1,000 especies bacterianas [13]. La microbiota habita en diferentes áreas del cuerpo, incluyendo el sistema gastrointestinal, el sistema genitourinario, la boca, el conducto nasofaríngeo, el sistema respiratorio y la piel.

3.1.1. Microbiota de la piel

La piel es la capa más extensa y expuesta del cuerpo humano y puede ser fácilmente colonizada por MO del entorno. Sin embargo, la piel es un entorno inhóspito para los MO debido a su sequedad, a la secreción de ácido láctico que tiene propiedades antisépticas, y a la escasez de nutrientes. No obstante, estas condiciones no son las mismas en las glándulas sudoríparas, sebáceas y los folículos pilosos, ya que aquí se encuentran niveles más altos de humedad y nutrientes [14]. La microbiota de la piel del recién nacido (RN) cambia con el tiempo y puede ser afectada por varios factores, como las características de la piel, el desarrollo del sistema inmunológico, las exposiciones ambientales por ejemplo la estancia en Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN), y el uso de antibióticos [15]. La piel del RN está dominada por *Firmicutes* seguida de *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*. La sepsis neonatal se considera de las principales morbilidades del RN prematuro, esta es causada por bacterias comensales propias de la microbiota de la piel como *Staphylococcus epidermidis*

coagulasa negativo que puede ser transmitido intrahospitalariamente por el personal de salud [16] [17].

3.1.2. Microbiota de la leche humana

Numerosos estudios han descrito que la madre proporciona bacterias a los lactantes a través de la leche humana (LH) [18]. En 2020, una revisión de 44 estudios donde se evaluaron 3,105 muestras de LH de 2,655 mujeres determinó que los géneros encontrados con mayor frecuencia son *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Cutibacterium* (antes conocido como *Propionibacterium*), *Veillonella* y *Bacteroides* [19]. Un estudio de cohorte de 428 binomios madre-hijo donde se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) de la LH y se secuenció el gen del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S región V4 en la plataforma Illumina MiSeq reportó que los filos más abundantes son *Proteobacteria* y *Firmicutes*, y los géneros más abundantes son *Streptococcus*, *Ralstonia* y *Staphylococcus* [20]. En cuanto a los factores que influyen en la composición de la microbiota de la LH se encuentran el sexo y la edad gestacional del RN, el tipo de nacimiento, la paridad, el uso de antibióticos intraparto, la etapa de la lactancia, el índice de masa corporal y la dieta de la madre, la composición de la leche materna, la infección por VIH, la ubicación geográfica y el método de recolección/alimentación [19].

3.1.3. Microbiota de la boca

En 2022, Selway y colaboradores analizaron los hisopados bucales de 50 RN prematuros y determinaron mediante secuenciación del gen ARNr 16S que a la semana de vida existe mayor abundancia de *Staphylococcus*, mientras que a las 6 semanas *Streptococcus* es más abundante [21].

3.1.4. Microbiota vaginal

La vagina en el periodo fértil alberga una microbiota distintiva compuesta principalmente por lactobacilos, siendo las especies predominantes *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* y/o *L. iners*. Los lactobacilos producen ácido láctico provocando que el pH vaginal sea de 4 a 4.5, y producen peróxido de hidrógeno que elimina a los MO de origen intestinal, lo cual permite controlar la densidad de patógenos potenciales [22].

3.1.5. Microbiota intestinal

La microbiota intestinal (MI) consiste en una comunidad estable de MO específica de cada persona en dos tercios y común en la mayoría de la población en un tercio, y puede pesar hasta 2 kilogramos en los adultos [13]. Aproximadamente el 20% de la variación en la composición de la MI es influenciada por factores como la dieta, los medicamentos, y genes específicos [3].

Una MI saludable se define como una composición idealizada de MO asociada a un estado de salud, lo cual implica que posee un perfil funcional óptimo, lleva a cabo sus funciones de manera adecuada y contribuye al bienestar general del organismo. Se caracteriza por su estabilidad ecológica, es decir tiene la capacidad de resistir cambios en la estructura de la comunidad de MO cuando se enfrenta a situaciones de estrés. Además, tiene la capacidad de regresar a su estado inicial después de experimentar cambios inducidos por factores estresantes. No existe una referencia ideal de una MI humana sana debido a la gran variación taxonómica de MO entre individuos de diferente demografía, etnia, sexo, edad y estado de salud [23].

3.2. Composición de la MI

La MI está constituida principalmente por bacterias y una minoría de virus, hongos y células eucariotas. Los filos bacterianos existentes en la MI incluyen *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacterias* y *Proteobacteria*. Los *Firmicutes* representan del 60 al 80% de la MI e incluyen más de 200 géneros donde destacan *Ruminococcus*, *Clostridium* y *Lactobacillus*. Los *Bacteroidetes* representan del 20 al 30% de la MI donde destacan *Bacteroides*, *Prevotella* y *Xylanibacter*, y las *Actinobacterias* representan el 10% donde predomina el género *Bifidobacterium*. Además, se

encuentran en menor abundancia (menor al 1%) *Proteobacteria* como *Escherichia* y *Enterobacteriaceae* [24].

La colonización de la MI del RN inicia a partir del nacimiento comenzando como un ecosistema dinámico dominado por *Bifidobacterias* transmitidas por la madre a través de la ingestión de la leche materna [25]. Conforme crece el RN la MI aumenta en diversidad y riqueza y alcanza su mayor complejidad en la edad adulta donde es dominada por los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. En las últimas etapas de vida, la composición de la MI decae en diversidad, es influenciada por la fragilidad de esta población vulnerable con alto riesgo de múltiples morbilidades, es más dinámica y se caracteriza por una mayor proporción de *Bacteroides* a *Firmicutes*, un aumento de *Proteobacteria* y una disminución de *Bifidobacterium* [26] (Figura 1).

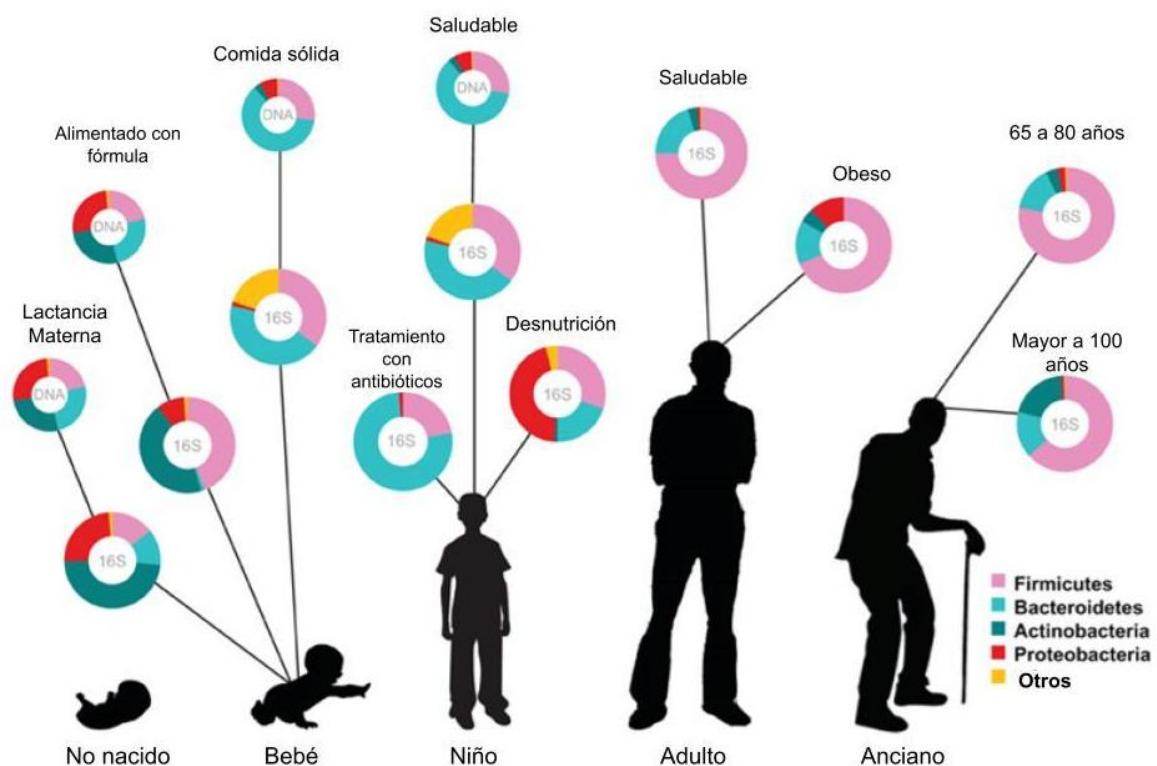


Figura 1. Microbiota humana desde nacimiento y a través de las etapas de la vida. Visión global de la abundancia relativa de filos bacterianos analizados mediante la secuenciación del gen ARNr 16S (16S) o enfoques metagenómicos (DNA) donde se indican factores que influyen en la composición de la MI. Modificada de [27].

3.3. Funciones de la MI

La MI desempeña un papel fundamental en la regulación de las funciones metabólicas, inmunitarias y endocrinas que participan activamente en la homeostasis y la salud humana [28].

3.3.1. Metabolismo y MI

La MI realiza funciones metabólicas al fermentar los carbohidratos de la fibra dietética produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que son utilizados por células del colon, conocidas como colonocitos, como fuente de energía. Los AGCC más comunes son el acetato, el propionato y el butirato. El butirato estimula la absorción de sodio y agua en el colon, desempeña un papel importante en el mantenimiento y la restauración de la integridad de la mucosa y el epitelio intestinal [29] [30], y su producción puede ser alterada por la dieta y el uso de antibióticos (Figura 2). Otras funciones de la MI son la absorción de electrolitos y minerales, la modulación de la motilidad intestinal, la regulación del almacenamiento de lípidos, y la síntesis de algunos micronutrientes como la vitamina K, la vitamina B12, la biotina, el ácido fólico y el ácido pantoténico [31].

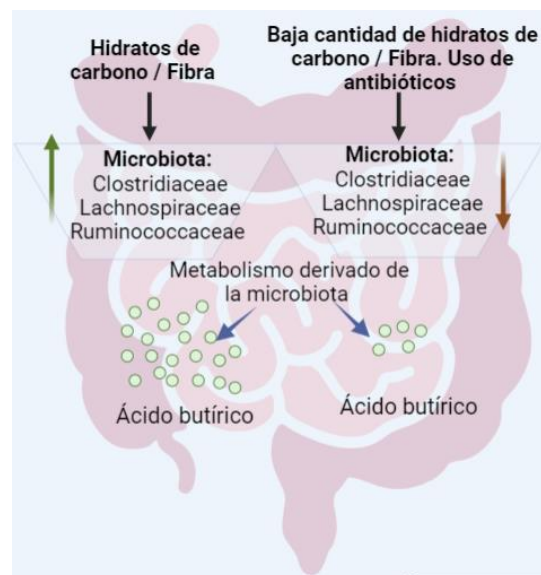


Figura 2. Microbiota y ácido butírico. La disrupción de la MI a causa del uso de antibióticos o por cambios en la dieta altera la capacidad de producción de ácido butírico. Modificada de [30].

3.3.2. Interacción hormonal

Algunas bacterias de la MI tienen la capacidad de producir o metabolizar hormonas, por ejemplo, *Bacillus* y *Serratia* son capaces de producir neurohormonas como la dopamina [32]. Esta interacción entre la microbiota y las hormonas demuestra la estrecha relación y el potencial impacto que la MI puede tener en la fisiología y el equilibrio hormonal del organismo.

3.3.3. Funciones inmunológicas

La MI interactúa con el sistema inmunitario del huésped y le proporciona señales que promueven la maduración de las células inmunes y el desarrollo normal de sus funciones, además de la eliminación de toxinas y carcinógenos, lo cual evita a su vez la colonización de bacterias patógenas. El sistema inmunitario reconoce y aprende a diferenciar entre bacterias comensales y patógenas en los primeros 2 años de vida, y cuando la MI alcanza la madurez permanece estable hasta la vejez [24].

Las bacterias comensales inducen respuestas de linfocitos B y la producción de anticuerpos como la inmunoglobulina G (IgG) y la inmunoglobulina A (IgA) que pueden ser transmitidos de madres a hijos a través de la placenta y la LH [33]. Además, bacterias intestinales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y metabolitos bacterianos como el butirato y el propionato inducen linfocitos T reguladores que tienen efectos antiinflamatorios como la terminación de actividades inflamatorias de mastocitos, basófilos, eosinófilos, la supresión de inmunoglobulina E (IgE) y la inducción de IgG4 [34], [35].

La barrera intestinal está formada por tres capas y está encargada de mantener la homeostasis evitando la entrada de sustancias nocivas, MO patógenos, factores proinflamatorios y antígenos, y permitiendo la colonización por bacterias comensales. La primera capa se forma de moco, agua y glicocálix, presenta propiedades hidrófobas y tensoactivas, y contiene IgA secretora y péptidos antimicrobianos. En la subcapa externa se encuentra la MI. La segunda capa se constituye por una monocapa de células epiteliales intestinales, y la tercera capa se compone por la lámina propia y el mesenterio.

3.4. Prebióticos

En Diciembre del 2016, la Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos (ISAPP, del inglés International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) definió a un prebiótico como “un sustrato que es utilizado selectivamente por los MO del huésped que confiere un beneficio para la salud” [36]. Los prebióticos pueden ser carbohidratos, polifenoles y ácidos grasos poliinsaturados convertidos en los respectivos ácidos grasos conjugados, y se caracterizan por no ser degradados por las enzimas del huésped objetivo. Los prebióticos estimulan bacterias como las *Bifidobacterias*, *Lactobacillus*, *Roseburia*, *Eubacterium*, y *Faecalibacterium spp.*

Algunos prebióticos con mayores beneficios en la salud humana son los oligosacáridos no digeribles, los fructooligosacáridos, y los galactooligosacáridos. Estos oligosacáridos son metabolizados principalmente por *Bifidobacterias* debido a sus enzimas β -fructosidasa y β -galactosidasa [36].

Según la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, algunos beneficios de los prebióticos son la reducción de los niveles de glucosa y colesterol en sangre, la reducción de la presión arterial, el aumento de la frecuencia de las deposiciones, el aumento de la absorción de minerales, el aumento de la sensibilidad a la insulina, y la producción de energía a través de la fermentación colónica [37].

Las principales fuentes de carbohidratos que alimentan la MI infantil incluyen los oligosacáridos de la leche humana (HMOs, del inglés Human Milk Oligosaccharides), los glucanos endógenos como las mucinas, los monosacáridos no digeridos y la lactosa. Estos carbohidratos complejos son metabolizados principalmente por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Bacteroides* en azúcares más simples, como la lactosa. Los azúcares simples son metabolizados por MO glicolíticos, incluyendo bacterias productoras de lactato como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Enterobacteria*.

3.4.1. HMOs

La madre promueve activamente la transferencia de miembros específicos de su microbiota a sus hijos. Esta transmisión vertical selectiva de MO es promovida por los HMOs que favorecen el crecimiento de bifidobacterias [25]. Los HMOs son carbohidratos no digeribles que llegan intactos al intestino grueso donde actúan como nutrientes para bacterias benéficas, regulando selectivamente la composición de la MI infantil que es dominada por *Bifidobacterium* en lactantes [38]. En particular, *Bifidobacterium infantis* metaboliza directamente los HMOs complejos.

3.5. Probióticos y su administración

De acuerdo con la ISAPP, los probióticos se definen como MO vivos que al administrarse en dosis adecuadas proporcionan un beneficio en la salud del huésped [39].

El mecanismo de acción de los probióticos es variado, por ejemplo *Lactocaseibacillus rhamnosus GG* excluye competitivamente bacterias patógenas a través de su pili dependiente de sortasa SpaCBA. Los pili son apéndices cortos en forma de pelo presentes en la superficie de varias bacterias, que participan en la inmunomodulación de macrófagos y células dendríticas [40]. Los probióticos poseen la capacidad de replicarse en el huésped y persistir a través del tiempo, producen sustancias antimicrobianas, interfieren con la adherencia y virulencia de patógenos, modulan la inmunidad del huésped, y mejoran la función de la barrera epitelial [41], [42].

3.5.1. Beneficios en Infantes

Los beneficios de los probióticos en infantes son variados, se utilizan en el tratamiento de cólicos en lactantes [43], en el tratamiento de la diarrea aguda en infantes [44], y en la prevención de enterocolitis necrosante (ECN) en neonatos prematuros [45] [46].

Las especies de *Bifidobacterium* promovidas por los HMOs convierten los aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina) en sus respectivos ácidos lácticos aromáticos (ácido indol-láctico, ácido fenil-láctico, y ácido 4-hidroxi-fenil-

láctico) mediante la acción enzimática de una lactato deshidrogenasa aromática (Figura 3). Un estudio longitudinal donde se analizó la composición de la MI y el metaboloma de 25 infantes daneses desde el nacimiento hasta los 9 meses, demostró que las concentraciones fecales de ácidos lácticos aromáticos correlacionan positivamente con la abundancia de especies de *Bifidobacterium* degradadoras de HMOs incluyendo *B. longum*, *B. breve* y *B. bifidum*. Este estudio reportó que el ácido indol-láctico (ILA) está presente en las heces de infantes amamantados y modula respuestas inmunes al actuar como agonista del receptor de hidrocarburos arílicos (AhR) y del receptor 3 de ácido hidróxicarboxílico (HCA3). El ILA indujo la producción de IL-22 en linfocitos T de tipo 17 (Th17) y redujo la producción de IL-12p70 en monocitos estimulados con LPS e interferón gamma, sugiriendo que este ácido láctico aromático producido por especies de *Bifidobacterium* podría ser un modulador importante de las respuestas inmunes en la vida temprana [47].

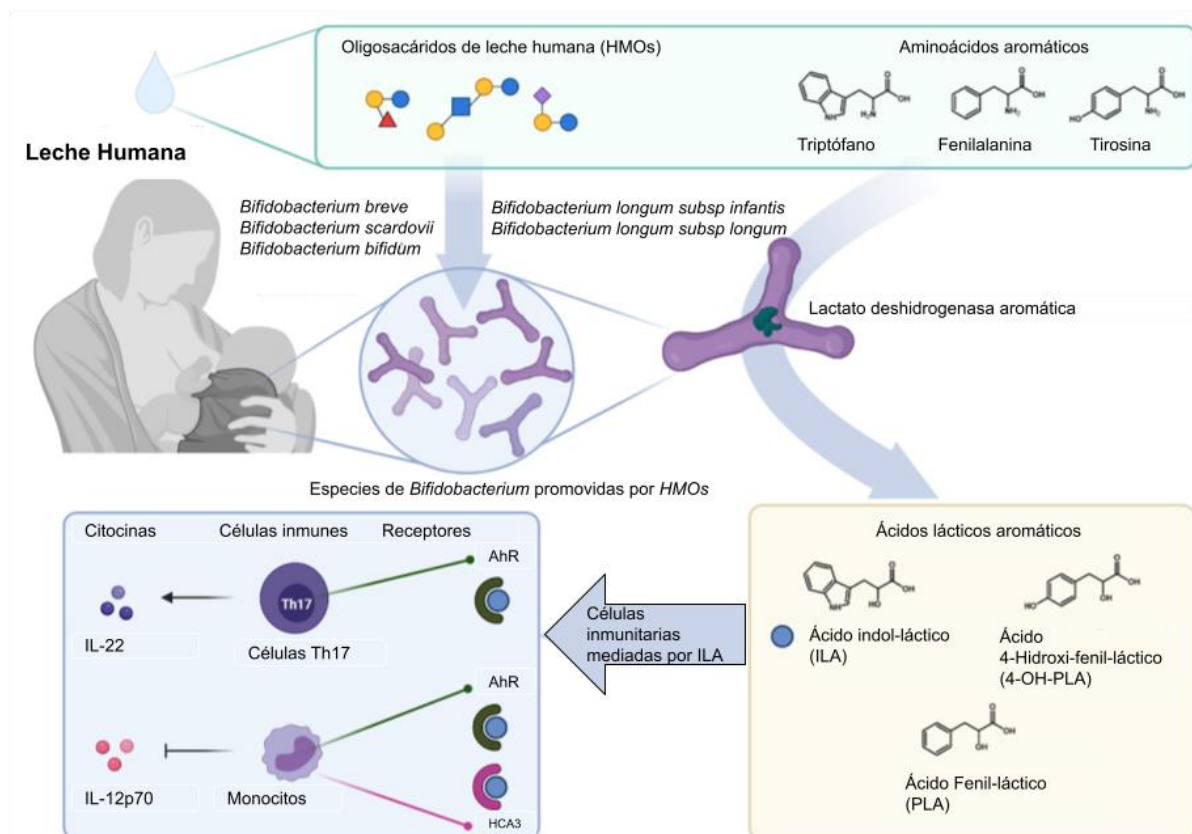


Figura 3. Prebióticos y Probióticos presentes en la leche humana. Las especies de *Bifidobacterium* que utilizan oligosacáridos de la leche humana (HMOs) producen ácidos lácticos aromáticos inmunoreguladores en el intestino de los

infantes. Las especies de *Bifidobacterium* que utilizan los HMOs son más capaces de producir ácidos lácticos aromáticos a partir de aminoácidos aromáticos como el triptofano, la fenilalanina y tirosina, por reacciones enzimáticas (primero una transaminación seguida de una hidrogenación) por la lactato deshidrogenasa aromática. La ILA modula las respuestas de citocinas en linfocitos Th17 y provoca un aumento en la producción de IL-22 de manera dependiente de la dosis y del AhR. En monocitos estimulados con LPS e interferón gamma se determinó que ILA podía disminuir la producción de citocina proinflamatoria IL-12p70, de manera dependiente del AhR como del receptor del HCA3. *HMOs: Oligosacáridos de leche humana; ILA: ácido indol-láctico; 4-OH-PLA: 4-hidroxifenil-láctico; PLA: ácido fenil-láctico; AhR: receptor de hidrocarburos arílicos; HCA3: receptor 3 de ácido hidróxicarboxílico.* Modificado de [48]

3.6. Neonatos prematuros

El proceso de gestación se lleva a cabo en 37 a 40 semanas desde la ovulación y se define como neonato prematuro al RN vivo antes de las 37 semanas de gestación (SDG). Los RN prematuros pueden clasificarse en tres categorías de acuerdo con las SDG al nacimiento: los moderados a tardíos van de las 32 a antes de las 37 SDG, los muy prematuros van de las 28 a antes de las 32 SDG, y los prematuros extremos son los menores de 28 SDG [49]. Los RN prematuros presentan diversas complicaciones de salud y son altamente susceptibles a enfermedades infecciosas e inflamatorias debido a su sistema inmune inmaduro [50].

3.6.1. Sepsis temprana, sepsis tardía y choque séptico

La sepsis se define como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección [51].

La sepsis neonatal se clasifica en dos grupos de acuerdo con el tiempo de presentación después del nacimiento, la sepsis neonatal temprana (EOS, por sus siglas en inglés Early-Onset Sepsis) y la sepsis neonatal tardía (LOS, por sus siglas en inglés Late-Onset Sepsis). La EOS ocurre en las primeras 72 horas de vida y se debe a factores de riesgo perinatal como infecciones genitourinarias maternas, corioamnionitis, ruptura prematura de membranas y la presencia de estreptococo del grupo B en vagina, recto o vías urinarias [52]. La LOS ocurre después de las primeras 72 horas de vida, se debe a factores de riesgo nosocomiales y es una

complicación frecuente en RN prematuros, afectando a un 25% de los RN de muy bajo peso al nacer (menores de 1,500 gramos) [52].

El choque séptico se define como un tipo de sepsis en el que anomalías metabólicas, celulares y circulatorias subyacentes son lo suficientemente profundas para aumentar sustancialmente la mortalidad [51].

3.6.2. Enterocolitis necrosante

La enterocolitis necrosante (ECN) es una de las principales causas de mortalidad en RN prematuros, su etiología es multifactorial, y en esta patología segmentos del tracto gastrointestinal del lactante sufren isquemia y posteriormente necrosis [4]. Un estudio de 32 neonatos prematuros de muy bajo peso al nacer donde se analizó la composición de la MI mediante la secuenciación del gen ARNr 16S reportó la dominancia de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, y *Staphylococcus* [5].

3.6.3. Enfermedades relacionadas con alteraciones de la MI

Alteraciones en la MI microbiota intestinal se han relacionado a diversas enfermedades, por ejemplo, el uso de antibióticos en etapas tempranas de la vida se ha asociado a asma y obesidad [53], ECN [4], y la enfermedad de Crohn [54]

3.7. Inicio de la colonización

Existe un debate sobre el inicio de la colonización bacteriana en los seres humanos. Se ha sugerido que existe colonización bacteriana intrauterina, que se produce en el líquido amniótico y la placenta, donde existe una baja densidad y diversidad de MO y el filo más común es *Proteobacteria*. Se ha identificado la presencia de ADN de bacterias de los géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Lactobacillus* y *Cutibacterium* en el líquido amniótico, la placenta, y el meconio [55]. También se ha sugerido que existe la translocación de bacterias de las cavidades oral y vaginal de la madre hacia la placenta a través del torrente sanguíneo [56]. Otros autores defienden el principio de la esterilidad intrauterina argumentando que la presencia de bacterias en el meconio puede deberse a factores de contaminación externa, y que en el momento que el saco amniótico se rompe durante el nacimiento ya sea por parto o cesárea, la esterilidad termina [57]. Se ha sugerido que el feto está expuesto a la microbiota

materna y sus metabolitos que atraviesan la placenta y entran al líquido amniótico [58]. Sin embargo, diversos estudios aseguran que la detección de ADN bacteriano en líquido amniótico, placenta y meconio se debe a la contaminación que ocurre durante la toma y procesamiento de las muestras y la experimentación en los laboratorios, y que estos en realidad son estériles [59], [60].

3.8. Factores que modulan el establecimiento de la microbiota intestinal infantil.

- **Prematurez**

Un factor importante en la colonización de la MI es el tipo de nacimiento y la edad gestacional al nacimiento, según un estudio que analizó la MI de 206 neonatos prematuros y a término mediante la secuenciación del gen ARNr 16S, mostró que la familia bacteriana dominante en neonatos prematuros es *Enterobacteriaceae* detectada en el 32% de las muestras, seguida de los géneros *Clostridium*, *Enterococcus* y *Veillonella*. En los neonatos a término, la familia *Enterobacteriaceae* también fue la más común, identificada en el 20% de las muestras, seguida por los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* [61].

- **Tipo de nacimiento**

En diversos estudios se ha demostrado que los lactantes que nacen por el canal vaginal presentan una MI más abundante y diversa que aquellos lactantes que nacen por cesárea [62], [63]. Un estudio de 120 lactantes sanos que caracterizó la composición y la dinámica de la MI infantil durante el primer año de vida reportó que los lactantes nacidos por vía vaginal presentan un enriquecimiento de *Bifidobacterium spp* y una reducción de *Enterococcus* y *Klebsiella* potencialmente patógenos [64], mientras que los lactantes nacidos por cesárea encontró una mayor densidad de *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Cutibacterium*, que provienen de la cavidad oral y de la piel materna [34], y probablemente del quirófano y el personal de salud [65; 66].

- **Tipo de alimentación**

Después del nacimiento, la lactancia materna regula la MI del lactante al proporcionar factores que promueven selectivamente el crecimiento de bacterias específicas como las bifidobacterias [55]. La LH contiene bacterias que se

encuentran en el pezón, los conductos galactóforos y la piel circundante como *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Cutibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, y *Bifidobacterium* [55]. Se han descrito diferencias en la composición de la MI de los neonatos dependiendo de su tipo de alimentación, ya sea con LH o con fórmula láctea. Los neonatos alimentados con fórmula láctea presentan una mayor densidad de bacterias anaerobias facultativas, como *Bacteroides* y *Clostridium*, una sobrerrepresentación de *C. difficile* y una colonización tardía por *Bifidobacterium* en comparación con aquellos alimentados con LH [34].

La lactancia materna tiene múltiples beneficios, ayuda a mantener una buena motilidad intestinal y promueve la maduración del sistema inmunológico. Provee de IgA, lactoferrina, oligosacáridos secretorios y acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas al lactante y previene la disbiosis intestinal [55]. Después del destete del neonato y la introducción de alimentos sólidos a los 6 meses aproximadamente, incrementa la abundancia de los géneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, y *Veillonella* en el intestino. Alrededor de los 2 a 3 años de vida la MI infantil se estabiliza y semeja a la del adulto [34].

- **Uso de antibióticos**

Los neonatos prematuros presentan un sistema inmunológico y gastrointestinal inmaduro lo cual incrementa su susceptibilidad a infecciones bacterianas, surgiendo la necesidad de administrar antibióticos para evitar complicaciones de salud. Los antibióticos, como todo fármaco se distribuyen por el sistema circulatorio, produciendo su efecto bactericida y/o bacteriostático sin discriminación, afectando tanto a la microbiota patógena como a la comensal, y provocando un desequilibrio en la densidad y/o diversidad de la MI [56]. La magnitud de la alteración puede estar influenciada por varios factores, como la duración del tratamiento, la dosis administrada, el rango de acción del antibiótico, la forma en que se administra y las características específicas del medicamento, como su farmacodinamia y farmacocinética [67]. Los antibióticos perinatales afectan profundamente el establecimiento de la MI del lactante prematuro y conducen al incremento de bacterias patógenas como *Proteobacteria*, *Streptococcus* y *Pseudomonas*, y a la reducción de bacterias benéficas como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* [67].

3.9. Administración de antibióticos neonatales en el INPer-IER

Los criterios empleados en la Institución para iniciar la administración de antibióticos en la UCIN y la Unidad de Cuidados Intermedios al Recién Nacido (UCIREN) son (Tabla 1):

- Antecedentes maternos de infección que pongan en riesgo de sepsis al neonato: enfermedades genitourinarias activas, fiebre, y presencia de estreptococo tipo b en la vagina.
- Sospecha o diagnóstico de sepsis neonatal temprana, sepsis neonatal tardía, enterocolitis necrosante, choque séptico, y neumonía por bacterias atípicas.

Tabla 1. Esquemas de antibióticos neonatales usados en el INPer-IER. Modificada de [68].

Diagnóstico clínico	Antibióticos administrados
Riesgo de sepsis Sepsis temprana	Ampicilina + Amikacina
Sepsis tardía Enterocolitis necrosante	Piperacilina/ Tazobactam + Vancomicina
Choque séptico	Meropenem
Neumonía por bacterias atípicas	Claritromicina

3.9.1. Características de los antibióticos neonatales usados en el INPER-IER

Ampicilina: antibiótico betalactámico de penicilina de amplio espectro utilizado en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas y de algunos anaerobios. La ampicilina tiene actividad bactericida al inhibir la síntesis de la pared celular mediante la unión a las proteínas de unión a la penicilina, provocando la lisis celular a través de enzimas autolíticas presentes en la pared celular bacteriana [69].

Amikacina: aminoglucósido semisintético usado como tratamiento de infecciones causadas por cepas más resistentes de bacterias Gram negativas como

Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* y algunas bacterias Gram positivas. Los aminoglucósidos se unen a las subunidades ribosomales 30S bacterianas, impidiendo la unión del ARN mensajero y los sitios aceptores del ARN de transferencia incapacitando a las bacterias para sintetizar proteínas esenciales para su crecimiento, provocando la producción de péptidos no funcionales o tóxicos [70].

Piperacilina: antibiótico de ureidopenicilina semisintético de amplio espectro utilizado para tratar infecciones por *Pseudomonas* o infecciones polimicrobianas de bacterias aerobias y anaerobias, grampositivas y gramnegativas. La piperacilina se une a proteínas de unión a penicilina en la pared celular bacteriana, lo que inhibe la síntesis final de la pared celular y posteriormente la lisis celular mediada por enzimas autolíticas de la pared bacteriana [71].

Tazobactam: antibiótico inhibidor de la betalactamasa que interfiere con la degradación de antibióticos por organismos productores de enzimas betalactamasas. Cuando se combina con piperacilina se usa para infecciones causadas por bacterias aerobias y facultativas grampositivas y gramnegativas, además de anaerobios grampositivos y gramnegativos. Tazobactam muestra poca actividad antibacteriana por sí mismo, y por esta razón no se administra solo [72].

Vancomicina: antibiótico glicopeptídico obtenido de *Streptomyces orientalis*, usado para tratar infecciones bacterianas graves por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Su acción bactericida resulta de la inhibición de la biosíntesis de la pared celular [73].

Meropenem: antibiótico de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Actúa penetrando en las células bacterianas y alterando la síntesis de componentes esenciales de la pared celular al interactuar con la proteína fijadora de penicilina. También se utiliza en el tratamiento de la meningitis bacteriana causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* [74].

Claritromicina: antibiótico macrólido semisintético derivado de la eritromicina que inhibe la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a la subunidad 50S e inhibe la

actividad de la peptidil transferasa, interfiriendo con la translocación de aminoácidos durante el proceso de traducción y ensamblaje de proteínas [75]

3.10. Caracterización de la MI

El cultivo de algunas bacterias de la MI en medios tradicionales resulta difícil, lo que dificulta su aislamiento e identificación. Como solución, se han empleado técnicas moleculares para su caracterización como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) y la secuenciación del ARNr 16S.

3.10.1. PCR

Esta es una técnica de biología molecular fundamentada en la amplificación de un fragmento de ADN utilizando una enzima llamada polimerasa. Esta reacción requiere de varios componentes, un ADN molde, oligonucleótidos monocatenarios (primers) de 20 a 30 bases de longitud que se unen a los extremos del ADN y delimitan la zona de ADN a amplificar por la ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs, del inglés deoxynucleotide triphosphates) que son componentes básicos del ADN (adenina, guanina, citosina y timina), una solución buffer para regular el pH y una solución de sal de cloruro de magnesio que sirven como cofactores de la ADN polimerasa al disociarse y al liberar el magnesio que tienen iones de carga positiva (+2) [76].

La reacción de PCR se lleva a cabo en un termociclador y consta de 3 etapas: 1) La desnaturalización del ADN bicatenario ocurre a 95°C durante 15 a 30 segundos para que las hebras del ADN se separen al romperse los enlaces de hidrógeno entre las bases y se formen cadenas de ADN simples, 2) Después sucede la alineación de los oligonucleótidos al ADN o hibridación que ocurre entre 50 a 65 °C durante 10 a 30 segundos, 3) Por último ocurre la amplificación o elongación del ADN a 72°C por 1 minuto donde la Taq polimerasa agrega los dNTPs en dirección 5' a 3' y se construye la cadena complementaria de ADN. Estas etapas se repiten de 20 hasta 40 veces aproximadamente, para así duplicar el número de copias de ADN cada vez obteniendo millones de copias de ADN [77].

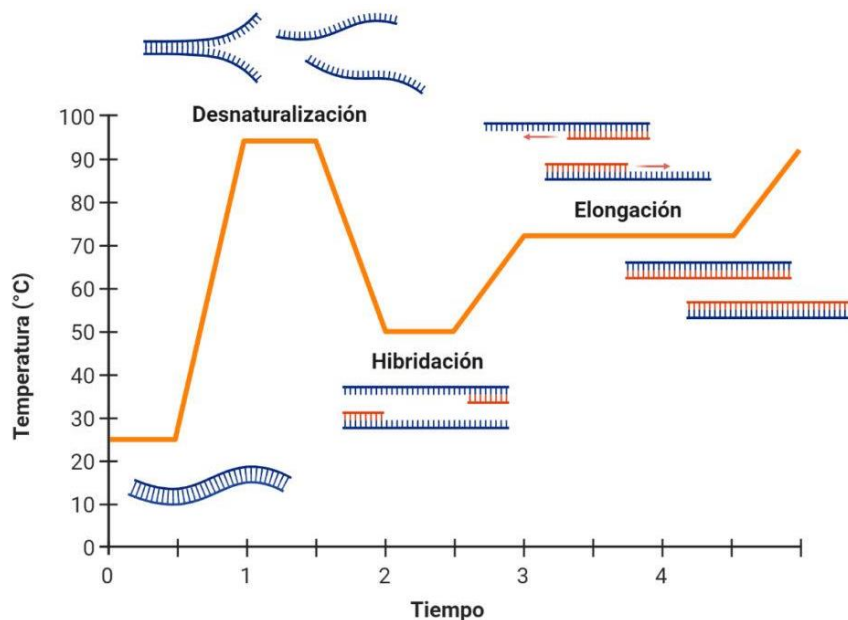


Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa. La gráfica representa las etapas de la PCR en función de la temperatura y el tiempo. La reacción comienza con la desnaturalización a los 95°C, después a los 50°C sucede la hibridación y a los 72°C sucede la elongación en aproximadamente 4 minutos, esto se repetirá en 30 ciclos en promedio.

3.10.2. Secuenciación del ARN ribosomal 16S

El ARNr 16S es la macromolécula más utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana, ciencia que se encarga de la clasificación biológica que agrupa a las bacterias según sus similitudes, donde se clasifica después de reino, filo, clase, orden, familia, género y especie, dando como resultado la identificación de dichos organismos. El ARNr 16 S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1,500 nucleótidos, y constituye el marcador ideal para la caracterización de la microbiota [77]. El gen ARNr 16S está presente en las bacterias y codifica para el ARNr 16S de los ribosomas bacterianos. El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (unidades Svedberg) y se disocia en dos subunidades, la subunidad grande 50S y la subunidad pequeña 30S. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S además de 16 proteínas diferentes (S1-S21) y la subunidad 50S contiene los ARNr 5S y 23S y 34 proteínas (L1-L34). El método molecular de identificación bacteriana mediante la secuenciación del gen ARNr 16S incluye 3 etapas, la primera

es la amplificación del gen a partir de la muestra, después se determina la secuencia de nucleótidos del amplicón y finalmente se analiza la secuencia [78].

3.10.2.1. Miseq Illumina

Por su alto rendimiento y sus bajos costos de secuenciación, MiSeq de Illumina se ha convertido en una de las plataformas de secuenciación más utilizadas en todo el mundo [79].

El proceso de secuenciación de Illumina consta de los siguientes pasos. En primer lugar, se realiza la amplificación de los fragmentos de ADN mediante la técnica de PCR en puente, con el objetivo de generar colonias (clústeres) de fragmentos idénticos. Luego, se procede a la detección de las bases en la secuencia utilizando etiquetas fluorescentes. La generación del clúster se lleva a cabo mediante la amplificación en puente, en la cual los fragmentos de ADN se colocan sobre una superficie de vidrio dividida en carriles. Cada carril está recubierto con oligonucleótidos complementarios a los adaptadores de cada fragmento que se va a secuenciar, lo que permite que cada fragmento se ancle en su respectiva celda de flujo.

Una vez que los segmentos están anclados, la polimerasa comienza a copiar la hebra de ADN, lo que da lugar a la formación de una hebra inversa complementaria. La hebra original es eliminada y la hebra inversa se pliega a través de una secuencia terminal y se une a su secuencia complementaria de oligonucleótidos, formando así un puente. Luego, la polimerasa genera una hebra complementaria que es idéntica a la original, lo que resulta en la formación de dos hebras clonadas del segmento inicial. Este proceso se repite múltiples veces a gran escala, produciendo millones de copias de cada fragmento [80].

Después de completar la amplificación clonal, todas las hebras inversas son removidas, dejando solamente las hebras idénticas a las originales. En este momento, se introducen en la placa nucleótidos modificados con etiquetas fluorescentes específicas para cada tipo. Estos nucleótidos contienen una modificación química conocida como terminadores reversibles, que impide la unión de más de un nucleótido marcado en cada sitio de reacción. Esto se hace con el

propósito de identificar correctamente cada punto en la secuencia, reduciendo así el riesgo de errores en este procedimiento [81].

3.10.2.2. Variante de secuenciación de amplicones

La variante de secuenciación de amplicones (ASV, del inglés Amplicon Sequence Variant) es un parámetro se fundamenta en métodos utilizados para identificar las secuencias exactas y su frecuencia en el análisis de la microbiota. Estos datos se combinan con un modelo de error durante la secuenciación para evaluar la probabilidad de que una lectura frecuente no sea un error del secuenciador. Se calcula un valor p para cada secuencia específica, donde la hipótesis nula es que la secuencia exacta es consecuencia de un error de secuencia. Luego, se filtran las secuencias en función de un umbral de confianza, seleccionando un conjunto de secuencias exactas que tienen una confianza estadística determinada [82].

Los beneficios de utilizar las ASV radican en su comparabilidad entre diferentes estudios que han utilizado la misma región objetivo. Esto se debe a que las secuencias exactas generadas por los ASV no requieren agrupación ni bases de datos de referencia. Además, una secuencia de un gen objetivo siempre generará el mismo ASV, y se puede comparar con bases de datos de referencia de manera más precisa, permitiendo una identificación taxonómica más precisa hasta el nivel de especie e incluso más allá [83].

3.10.3. Análisis de diversidad de la microbiota

La diversidad integra tres elementos, la riqueza, la equidad y la disparidad. La riqueza se refiere al número total de especies que están en un ambiente, mientras que la equidad es una medida de uniformidad en la distribución de las abundancias de las especies, es decir que entre más homogénea será más equitativa una comunidad y la disparidad es una medida que se refiere a que tan similares son las especies. La diversidad no tiene un valor absoluto por eso al reportarse es relativa y está sujeta al método utilizado [84]. Los cambios en la microbiota se evalúan midiendo cambios en su diversidad alfa (α) y diversidad beta (β) esto utilizando ASV como un semejante a especies. La diversidad α mide la diversidad entre muestras y esta puede ser comparada por grupos y la diversidad β indica la medida de disimilitud entre 2 o más muestras, lo que refleja el cambio en la composición de las

comunidades biológicas [85]. QIIME2 con DADA2 proporciona la mejor estimación de la riqueza, basada en la secuenciación de comunidades simuladas complejas [82; 86; 87].

Chao1 es una medida para riqueza ajustada por probabilidad de no observar especies, ésta deriva del límite inferior de riqueza de especies no detectadas en términos del número de singletons y doubletons, el límite inferior correspondiente de la riqueza de especies que se da a continuación se denomina estimador Chao1 [88].

Shannon mide la diversidad, este índice demuestra la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de 2 factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa [89].

El índice de Simpson mide la uniformidad, es una media aritmética ponderada de abundancia proporcional y mide la probabilidad de que dos individuos seleccionados aleatoriamente de una muestra pertenezcan a la misma especie. cuanto mayor se acerque a 1 menor será la diversidad [89].

Componentes principales

Los componentes principales son combinaciones lineales de las variables originales que capturan la varianza en los datos. La gráfica de densidad muestra visualmente las densidades del segundo componente principal en relación con el primero, lo cual permite evaluar la estructura de los datos y detectar conglomerados, valores atípicos y tendencias [90].

LEfSe es una representación gráfica utilizada en análisis discriminante lineal, es una herramienta que se emplea para evaluar el tamaño del efecto. Su principal objetivo es facilitar las comparaciones entre clases de alta dimensión, enfocándose especialmente en análisis metagenómicos. Este método permite identificar las características que tienen mayor probabilidad de explicar las diferencias entre las clases al combinar pruebas estándar de significancia [91].

4. Justificación

A nivel mundial la tasa de nacimientos prematuros oscila entre un 5% y un 18 % de los RN, y cada año nacen aproximadamente 15 millones de lactantes prematuros. Parte de la solución es el cuidado especial, considerando la administración de antibióticos para tratar y prevenir las infecciones (OMS, 2018). Los antibióticos administrados afectan la microbiota del neonato, alterando la diversidad de especies y la composición de la comunidad [14,92].

Recientemente, el estudio de la microbiota ha tenido un gran impacto al revelar su conexión con funciones metabólicas e inmunológicas. Además, se ha observado que la alteración de la microbiota en etapas tempranas de la vida aumenta el riesgo de enfermedades como sepsis y enterocolitis necrosante en neonatos prematuros, así como enfermedades inmunológicas, alergias, obesidad y diabetes, que pueden desarrollarse en la niñez o en la adultez. Es crucial en salud pública comprender las consecuencias de los tratamientos con antibióticos en neonatos prematuros y desarrollar estrategias para contrarrestar los efectos adversos en la salud, como la administración de prebióticos y probióticos, ajustar las dosis de los esquemas y realizar un seguimiento de la microbiota.

5. Pregunta de investigación

¿Qué efecto tiene el tratamiento con antibióticos en la densidad y diversidad de la MI en lactantes prematuros?

6. Hipótesis

El tratamiento con antibióticos disminuirá la abundancia de bacterias benéficas y aumentará la abundancia de bacterias patógenas en la MI microbiota intestinal en lactantes prematuros

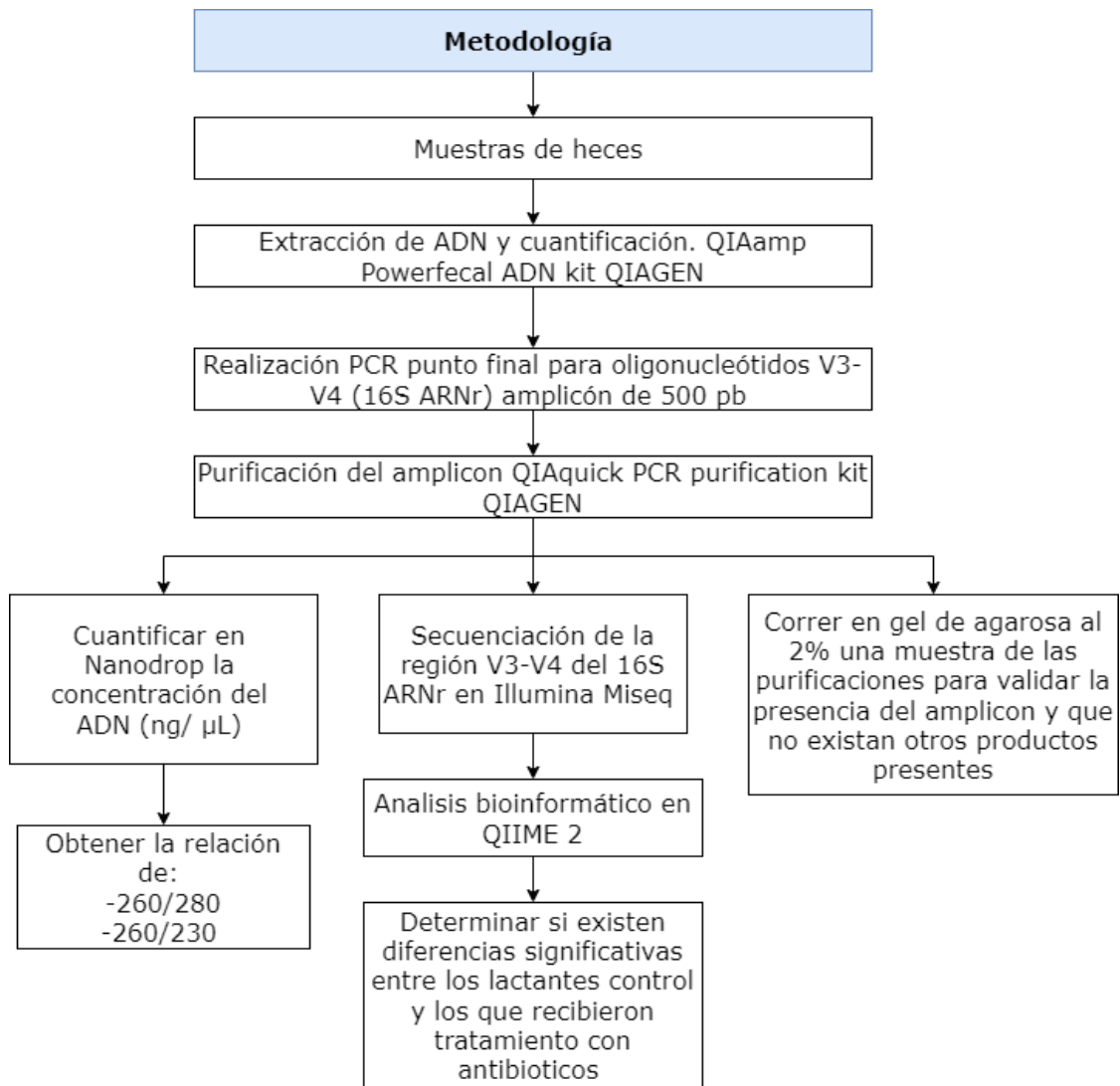
7. Objetivo general

Evaluar el efecto del tratamiento con antibióticos en la densidad y diversidad de la MI en lactantes prematuros mediante la secuenciación del gen ARNr 16S.

7.1. Objetivos específicos

1. Clasificar a los lactantes en 3 grupos de acuerdo con el uso de antibióticos en el periodo neonatal: 1) no recibieron tratamiento con antibióticos, 2) recibieron de 3 a 7 días de antibióticos, y 3) recibieron 8 o más días de antibióticos. Extraer el ADN de las heces para amplificar y purificar la región V3-V4 del gen ARNr 16S.
2. Comparar la composición de la MI de los lactantes al nacimiento, cerca del nacimiento, cerca del egreso, al egreso de la estancia hospitalaria, a los 6 y 12 meses mediante los análisis:
 - Composición taxonómica (Filo, Familia y Género)
 - Diversidad α (Chao1, Shannon, Simpson).
 - Diversidad β .
 - LEfSe
 - Análisis de Componentes Principales

8. Diagrama Experimental



9. Materiales

9.1. Reactivos:

- QIAamp® PowerFecal® DNA Kit marca QIAGEN
- QIAquick® PCR purification kit marca QIAGEN
- Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity
- Agarosa grado biología molecular marca Benchmark Scientific
- Oligonucleótidos sintetizados por Integrated DNA Technologies® (IDT)
- H₂O grado biología molecular marca Corning
- 100 bp DNA Ladder marca Invitrogen
- Buffer TBE (Tris borate EDTA)
- SYBR Safe DNA gel stain

9.2. Equipos

- Termociclador QIAamplifier 96
- Centrifuga 5420 marca eppendorf
- Nanodrop 2000/2000 C marca Thermo Scientific™
- Baño seco marca Thermo Scientific®
- Vortex VTX-5 marca CScientific®
- Transiluminador EpiChemi3 Darkroom
- Sistema de electroforesis Mini-Sub Cell Gt Cell marca Bio Rad
- Cabina de flujo laminar Clase II A/B3
- Balanza analítica marca OHAUS
- Equipo de secuenciación: Illumina MiSeq

9.3. Programas

- Qiime 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2).

10. Metodología

10.1. Estudio de población y diseño del estudio

Los criterios de elegibilidad en el estudio fueron recién nacidos prematuros con edad gestacional al nacer menor a 32 semanas de gestación, nacidos de madres mayores de 18 años entre marzo del 2018 y junio del 2019 en el INPer-IER. Este estudio longitudinal, analítico, observacional con un diseño de cohorte retrospectiva incluyó a recién nacidos prematuros masculinos y femeninos nacidos por parto vaginal y cesárea, hijos únicos y múltiples, con o sin tratamiento con antibióticos durante la estancia hospitalaria en la UCIN e UCIREN del INPer-IER.

Los criterios de exclusión considerados fueron aquellos recién nacidos prematuros con anomalías congénitas, diagnóstico de enfermedades autoinmunes y genéticas, nacidos de madres menores de 18 años o madres con infecciones como VIH y sífilis o consumo de drogas durante el embarazo o sin consentimiento informado de los padres. Para el análisis los neonatos fueron clasificados en 3 grupos, considerando el antibiótico neonatal (ABT). Días de tratamiento: sin antibióticos (No ABT) para los neonatos que no fueron tratados con antibióticos, de tres a siete días de antibióticos (3–7 d ABT), y ocho o más días de antibióticos (≥ 8 d ABT).

10.2. Datos maternos y de lactantes prematuros

Los datos maternos y de lactantes prematuros se recuperaron de registros médicos electrónicos. Las variables de recién nacidos prematuros analizadas fueron el tipo de nacimiento, las SDG, el sexo, la paridad (único, múltiple), restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), peso al nacer, tratamiento antibiótico prenatal, días de tratamiento con antibióticos, días de estancia hospitalaria, Apgar al minuto, Apgar a los 5 minutos, nutrición parenteral total (NTP), antropometría al egreso (peso, talla y perímetro cefálico). Los diagnósticos de neonatos prematuros analizados fueron EOS, LOS, choque séptico, enterocolitis necrosante, neumonía por atípicos, displasia broncopulmonar, conducto arterioso permeable, anemia, hiperbilirrubinemia, retinopatía del prematuro, hemorragia intraventricular, apnea.

Las variables maternas analizadas fueron edad materna, desnutrición, sobrepeso, obesidad, preeclampsia, hipertensión arterial, hipotiroidismo, diabetes gestacional.

10.3. Prácticas de alimentación.

El INPer-IER es un centro de salud de tercer nivel y un centro de referencia nacional en Perinatología donde se atiende embarazos de alto riesgo guiándose en lineamientos institucionales e internacionales de Neonatología. La institución cuenta con un banco de leche humana que se encuentra certificado por el Laboratorio de Control de Calidad para Leche Humana que es gestionado por la Red Brasileña de bancos de leche humana. Las prácticas de alimentación que se utilizaron en el instituto son como primera elección la leche propia de la madre, la segunda elección es leche humana pasteurizada de donante, y la tercera opción es la fórmula láctea para prematuros (F). Los neonatos estables comenzaron la alimentación trófica dentro de las 24 horas posteriores al nacimiento, mientras que los neonatos con RCIU y flujo sanguíneo placentario alterado se mantuvieron en ayunas. La alimentación enteral está contraindicada durante la distensión abdominal, obstrucción abdominal y bilis gástrica residual en sondas orogástricas. En neonatos <1.5 kilogramos, los aumentos en las tomas de leche son de 12.5 mL/ kg/ día y para neonatos >1.5 kilogramos, son de 25 mL /kg/día. La leche humana es fortificada (LHF) con un fortificante de leche a base de bovino a una concentración de 1:50 se inicia después de que la alimentación enteral alcanza los 100 ml/kg/día, y después de 3 días de tolerancia adecuada la concentración del fortificante en la leche humana se aumento 1:25. Se identifican 4 regímenes de alimentación neonatal: 1: LH exclusiva (incluye la leche materna y la leche humana pasteurizada de donante), 2: LH + LHF, 3: LH + LHF + F, y 4: LH + F. El día de vida donde alcanzaron los 150 mL/kg/día en alimentación enteral se recuperó de los registros médicos electrónicos.

10.4. Muestras de heces.

Se utilizaron las muestras de heces de neonatos prematuros provenientes del banco de muestras del laboratorio que se encontraban a -70°C. Las muestras se identificaron mediante el número de expediente del paciente, la edad y fecha en que se recolectaron las muestras.

10.5. Extracción de ADN en las muestras de heces

Se utilizó el kit QIAamp® PowerFecal® ADN kit de la marca QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante. Se descongelaron las muestras de heces en hielo y a continuación se inició el protocolo.

- Se pesó 200 mg de muestra de heces colocado en tubos de 2 mL que contienen cuentas secas de 0.7 mm. Se agregó 750 µL de solución “Powerbead” al tubo de cuentas secas y 60 µL de la solución “C1” (SDS y agentes de disrupción) y se invirtió varias veces o vortexeó brevemente. Se introdujeron los tubos en un baño seco caliente a 65°C por 10 minutos.
- Se colocaron los tubos en un adaptador de soporte para vortex y se vortexeó a velocidad máxima durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó los tubos a 13,000 rpm por 1 minuto y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de 2 mL. Se agregaron 250 µL de la solución C2 (elimina inhibidores y precipita material orgánico e inorgánico), se mezcló en vortex brevemente e incubó 5 minutos en hielo
- Las muestras se centrifugaron a 13,000 g por 1 minuto, posteriormente se recuperaron 600 µL del sobrenadante, se evitó tocar el pellet donde se transfirieron a tubos de recolección de 2 mL limpios y se agregó 200 µL de la solución C3 (precipita material orgánico e inorgánico y elimina inhibidores). Se incubaron las muestras de 2-8°C por 5 minutos y se centrifugaron a 13,000 g por 1 minuto. Se transfirió el sobrenadante a tubos de recolección limpios de 2 mL y se agregaron 1200 µL de solución C4 (alta concentración de sal) y se mezcló 5 segundos.
- Se colocó en tubos limpios de recolección de 2 mL las columnas “MB spin” y se agregó 650 µL de sobrenadante con solución C4, se centrifugaron a 13,000 g durante 1 minuto y se desechó el flujo continuo, se repitió hasta que se cargó el volumen total. Se agregó 500 µL de la solución C5 (solución a base de etanol) y se centrifugó a 13,000 g por 1 minuto, se descartó el flujo continuo y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones

- Se colocó la columna cuidadosamente en un tubo de recolección limpio de 2 mL y se agregó 100 µL de solución C6 (tampón de elución estéril) en el centro de la membrana del filtro blanco. Se realizó una centrifugación final a 13,000 g por 1 minuto y se desechó la columna MB spin. Se resguardó el ADN a -70°C hasta que se utilizó.

10.6. Cuantificación de ADN

Las muestras de ADN se descongelaron en hielo para posteriormente homogeneizarlas para así poder determinar su concentración a una absorbancia de 260 nm (A260) en el equipo Nanodrop 2000/2000 C marca Thermo Scientific™. Además, se utilizó la proporción A260/A280 para estimar la pureza del DNA. Se colocó 1 µL de muestra en el pedestal del equipo evitando la formación de burbujas, y una vez cuantificadas las muestras de ADN, se ajustó la concentración a 5 ng/ µL, esto utilizando como diluyente H₂O grado biología molecular para posteriormente realizar la PCR punto final.

10.7. PCR punto final para oligonucleótidos V3-V4

10.7.1. Oligonucleótidos

Tabla 2. Oligonucleótidos dirigidos a la región V3-V4 del ARNr 16S

Oligonucleótidos 5´ a 3´	Producto (pb)	T de alineación (°C)
Forward o sentido: TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG Reverse o antisentido: GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC	500	55

10.7.2. Mezcla de reacción PCR punto final.

La preparación de la mezcla de reacción de PCR punto final se realizó en la cabina de flujo laminar Clase II A/B3 se mantuvo los reactivos y muestras en hielo. Se preparó la mezcla en tubos eppendorf de 150 µL, según la tabla 2 a excepción del

ADN. Se utilizó la enzima Platinum PCR supermix High Fidelity, que es una mezcla de ADN polimerasa, sales, magnesio y Dntp (desoxinucleótidos). Se mezclaron los componentes de la reacción y se añadieron 45 µL a cada tubo de PCR de 200 µL y posteriormente se añadió el ADN de las muestras y controles.

10.7.3. Condiciones PCR punto final

La PCR fue realizada con el termociclador QIA amplifier 96. El equipo fue programado siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante

Tabla 3. Condiciones de PCR punto final

Condiciones de PCR punto final			
Paso	Etapas	Tiempo	Temperatura °C
1	Activación	3 minutos	95
2	Desnaturalización	30 segundos	95
3	Alineación	30 segundos	55
4	Extensión	30 segundos	72
5	Elongación final	5 minutos	72
6	Conservación	∞	4

Los pasos 1, 2, 3 y 4 se repitieron en 25 ciclos

10.8. Purificación de amplicón V3-V4 de ARNr 16S

Se purificó el amplicón utilizando el kit: QIAquick® Gel Extraction Kit (250) *QIAGEN*. Inicialmente se mezclaron los 50 µL de la reacción de PCR con 50 µL de buffer PB y se aplicó al centro de la columna, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto, después se descartó el tubo inferior y se colocó un nuevo tubo colector para agregar 750 µL de buffer PE al centro de la columna y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min, se cambió nuevamente el tubo colector y se volvió a centrifugar a 13,000 rpm por 1 minuto. Por último, se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1.5 mL previamente rotulado y se agregó 50 µL de H_2O grado biología molecular, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto para

eluir el DNA, se resguardó en el congelador para su posterior uso para realizar electroforesis.

10.9. Electroforesis en gel de agarosa al 2%

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

- Se pesaron 2 gramos de agarosa en balanza analítica y se disolvió en 100 mL de buffer Tris, Borato, EDTA (TBE) 1 X previamente filtrado en campana de extracción al vacío con Filter system 500 mL de la marca Corning, se calentó la mezcla hasta que quedó disuelto por completo. Se dejó atemperar la mezcla y se le agregó 10 µL de SYBR Safe DNA gel stain, y se mezcló cuidadosamente.
- Se agregó la agarosa al molde para formar el gel y se colocó el peine para la formación de los pozos que contendrían las muestras, se dejó solidificar la agarosa a temperatura ambiente y se retiró el peine con cuidado. Se colocó el gel en la cámara de electroforesis, cubriendo con buffer TBE 1X, Se cargaron las muestras previamente mezcladas con 5 µL de muestra, 4 µL de H_2O grado biología molecular y 1 µL de Blue Juice. Se cargó el marcador de peso molecular de 1000 pb en el primer carril.
- Se programó la cámara a 120 mV por 45 minutos. Una vez separadas las muestras, se colocó el gel en el transiluminador para observar las bandas favorecidas por la luz UV.

10.10. Estandarización de método

Se realizó un experimento previo para obtener la concentración ideal de los componentes de la reacción donde se probaron diferentes concentraciones de primers, ADN y la mezcla de reacción de PCR Platinum PCR supermix High Fidelity (Tabla 4). Se utilizó el ADN de un niño sano de 3 años y se

probaron 8 diferentes condiciones y el control de no templado (NTC). En la condición 1 se preparó la mezcla con 44 μL de Mastermix, 0.5 μL de cada primer (16-SF y 16-SR) a una concentración de 0.1 μM y 5 μL de DNA a una concentración de 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para tener 25 ng en total, no se diluyó la muestra obteniendo un volumen final de 50 μL . En la condición 2 se preparó la mezcla con 43 μL de Mastermix, 1 μL de cada primer (16-SF y 16-SR) a una concentración de 0.2 μM y 5 μL de DNA a una concentración de 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para tener 25 ng en total, no se diluyó la muestra obteniendo un volumen final de 50 μL .

En la condición 3 se preparó la mezcla con 35 μL de Mastermix, 0.5 μL de cada primer (16-SF y 16-SR) a una concentración de 0.1 μM y 5 μL de DNA a una concentración de 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para tener 25 ng en total, se diluyó la muestra agregando 9 μL H_2O grado biología molecular obteniendo un volumen final de 50 μL . En la condición 4 se preparó la mezcla con 35 μL de Mastermix, 1 μL de cada primer (16-SF y 16-SR) a una concentración de 0.2 μM y 5 μL de DNA a una concentración de 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para tener 25 ng en total, se diluyó la muestra agregando 8 μL H_2O grado biología molecular obteniendo un volumen final de 50 μL .

En la condición 5 se preparó la mezcla con 39 μL de Mastermix, 0.5 μL de cada primer (16-SF y 16-SR) a una concentración de 0.1 μM y 10 μL de DNA a una concentración de 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para tener 50 ng en total, no se diluyó la muestra obteniendo un volumen final de 50 μL . En la condición 6 se preparó la mezcla con 38 μL de Mastermix, 1 μL de cada primer (16-SF y 16-SR) a una concentración de 0.2 μM y 10 μL de DNA a una concentración de 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para tener 50 ng en total, no se diluyó la muestra obteniendo un volumen final de 50 μL .

En la condición 7 se preparó la mezcla con 35 μL de Mastermix, 0.5 μL de cada primer (16-SF y 16-SR) a una concentración de 0.1 μM y 10 μL de DNA a una concentración de 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para tener 50 ng en total, se diluyó la muestra agregando 4 μL H_2O grado biología molecular obteniendo un volumen final de 50 μL . En la condición 8 se preparó la mezcla con 35 μL de

Mastermix, 1 μL de cada primer (16-SF y 16-SR) a una concentración de 0.2 μM y 10 μL de DNA a una concentración de 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para tener 50 ng en total, se diluyó la muestra agregando 3 μL H_2O grado biología molecular obteniendo un volumen final de 50 μL .

Tabla 4. Estandarización de la amplificación de las regiones V3-V4 del ARNr 16S

Condición	1	2	3	4	5	6	7	8	9 NTC
Volumen	μL								
Mastermix	44	43	35	35	39	38	35	35	35
16-SF (10 μM)	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5
16-SR (10 μM)	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5
DNA (5 $\text{ng}/\mu\text{L}$)	5	5	5	5	10	10	10	10	-
H_2O	-	-	9	8	-	-	4	3	14
Volumen final	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Concentraciones finales									
Primers [μM]	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1
DNA [ng]	25	25	25	25	50	50	50	50	-

Posteriormente se corrió un gel en electroforesis para verificar cual condición es la ideal, donde la banda está óptima. Las muestras purificadas (P) indican que hubo un procedimiento de purificación con el kit QIAquick® Gel Extraction Kit (250) QIAGEN. Con el fin de mejorar la condición de las muestras. Se obtuvieron bandas en todas las condiciones sin purificar y purificadas, sin embargo, hubo condiciones donde se aprecian mejor las bandas siendo las condiciones: 1, 1P, 2, 2P, 4, 4P, 5, 5P, 6, 6P, 8, 8P (Figura 5) Las bandas de las condiciones 3, 3P 7 y 7 P, aunque están presentes, estas se observarán de menor intensidad. En el carril de NTC no se observó ninguna banda, mostrando que no se encuentran contaminados los reactivos utilizados, así como el procedimiento fue el adecuado, teniendo cuidado al manipular el experimento. Las mejores condiciones fueron la 2P y la 6P al

observarse las bandas más intensas y definidas. Considerando que en la condición 6P se utilizó mayor cantidad de DNA (10 μ L), y tendiendo un resultado igual de favorecedor con 2 P que se ocupó menos DNA (5 μ L), se decidió utilizar la condición 2 purificada para poder continuar nuestros experimentos.

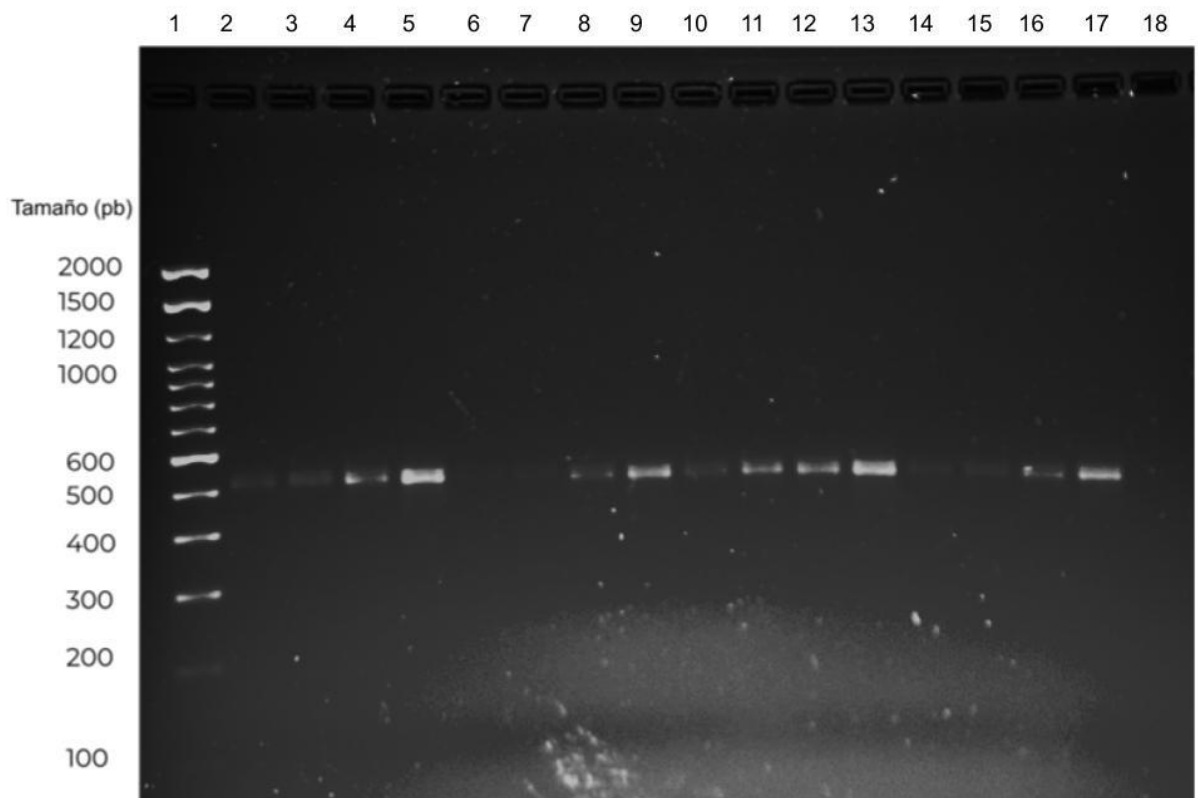


Figura 5. Productos de PCR estandarización

Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se muestran los productos de PCR amplificados a partir del DNA extraído de heces. (1) Marcador de peso molecular en pares de bases (pb), (2) condición 1, (3) condición 1 purificada, (4) condición 2, (5) condición 2 purificada, (6) condición 3, (7) condición 3 purificada, (8) condición 4, (9) condición 4 purificada, (10) condición 5, (11) condición 5 purificada, (12) condición 6, (13) condición 6 purificada, (14) condición 7, (15) condición 7 purificada, (16) condición 8, (17) condición 8 purificada, (18) NTC (control de no templado). Se observa en el carril 5 (Condición número 2 purificada) la mejor al obtener una banda mejor definida y utilizar menos ADN muestra

10.11. Cuantificación de microbiota intestinal mediante secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S ribosomal.

Se llevó a cabo la PCR punto final de alta fidelidad con el kit Platinum PCR

supermix High Fidelity (Invitrogen) utilizando como templado el ADN extraído de las heces de 80 lactantes con antecedente de nacimiento prematuro para producir un amplicón de aproximadamente 500 pb correspondiente a la región V3- V4 del gen 16S ribosomal. El amplicón generado fue entregado a la Unidad de Secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) donde se realizó el indexado, la preparación de librerías y la secuenciación por síntesis de lecturas pareadas de 2 x 250 pb (500 ciclos) en la plataforma Illumina MiSeq. El análisis de las secuencias se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Berenice Palacios González del INMEGEN.

10.12. Análisis Bioinformático

Las lecturas fastq de Illumina se procesaron con el paquete de Software (QIIME 2, del inglés Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2). La calidad de eliminación de ruido, la verificación de quimeras y la agrupación se realizaron utilizando la instrucción emparejada de eliminación de ruido dada 2 (Callahan et al., 2016) (Bolyen et al., 2019). La base de datos SILVA (release_138) se usó como la base de datos 16S de referencia, junto con el clasificador entrenado basado en el algoritmo naïve Bayes para una asignación taxonómica al 97 %, usando la instrucción de clasificador de características classify-sklearn. Se generó un árbol filogenético enraizado para más pruebas estadísticas de diversidad Shannon, Simpson y Chao α , y pruebas de diversidad UniFrac β no ponderadas y PCoA derivado (Análisis de coordenadas principales), utilizando Phyloseq y Vegan R Packages.

Con el paquete DeSeq2 R de Bioconductor, se realizó un análisis de abundancia diferencial, con corrección de inferencia múltiple de Benjamini-Hochberg, para identificar variantes de secuencia del amplicón (ASV por sus siglas en inglés) diferencialmente abundantes entre los grupos de estudio. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con una p ajustada $<0,05$.

10.13. Análisis estadístico

Los datos son descritos como la media \pm el error estándar. Los datos paramétricos como lo es la SDG, peso, edad, Apgar 1 minuto, de los grupos de estudio fueron analizados primero con una prueba de normalidad Shapiro Wilk para identificar qué prueba estadística utilizar, si es normal se aplicó análisis de varianza (ANOVA) de

una vía con post-test de Tukey, si no es normal se aplicó test de Kruskal Wallis con post-test de Dunn en el programa GraphPad Prism versión 8. Los datos no paramétricos como tipo de alimentación, enfermedades de la madre o patologías del neonato fueron analizados con Prueba de probabilidad exacta de Fisher o Chi-cuadrada con el programa Fisher Exact Probability Test: 2x3 de VassarStats. Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

11. Resultados

Entre marzo del 2018 y junio del 2019, 17 neonatos prematuros menores a 37 semanas de edad gestacional nacidos de madres > 18 años, fueron elegibles para participar en este estudio observacional, longitudinal, analítico con diseño de cohorte retrospectiva, previo consentimiento informado de la madre. Se analizaron 17 infantes prematuros y se clasificaron en 3 grupos de estudio según los días que recibieron tratamiento de antibióticos (ABT) durante el periodo neonatal: sin antibióticos (No ABT, n=3), de tres a siete días de ABT (3-7 d ABT, n=7), y ocho o más días de ABT (≥ 8 d ABT, n = 7). Se analizaron 19 muestras de grupo control, que corresponden a 2 de nacimiento (1_1), 5 cercanas al egreso (1_3), 7 al egreso (1_4), 2 a los 6 meses (1_5), 3 a los 12 meses (1_6). En el grupo 3-7 días ABT se analizaron 35 muestras que corresponden a 3 de nacimiento (2_1), 2 cercanas al nacimiento (2_2), 6 cercanas al egreso (2_3), 8 al egreso (2_4), 9 a los 6 meses (2_5), 7 a los 12 meses (2_6). En el grupo ≥ 8 d ABT se analizaron 26 muestras que corresponden a 3 cercanas al egreso (3_3), 8 al egreso (3_4), 8 a los 6 meses (3_5), 7 a los 12 meses (3_6).

En la tabla 5 se observan los datos demográficos, antropométricos, diagnósticos clínicos y tipo de alimentación neonatal, así como también los antecedentes infecciosos maternos de los grupos de estudio. La mayoría de los neonatos del grupo control nacieron vía cesárea y presentaron una media de 32.2 SDG clasificándolos en neonatos prematuros moderados a tardíos, el grupo de 3-7 días ATB nacieron la mayoría por cesárea al igual que los ≥ 8 días de antibiótico. Los neonatos del grupo 3-7 días de antibiótico (3-7 d ABT) tuvieron en promedio 29.3 SDG, mientras que el grupo de 8 o más días de antibiótico (≥ 8 d ABT) fue en promedio de 27.7 SDG categorizando a los neonatos de estos grupos como prematuros extremos. Se observó una diferencia estadística entre las SDG del grupo control en comparación con el grupo ≥ 8 días ABT, resultando este último menor. En el grupo control en su totalidad fueron del género femenino y en los grupos de antibiótico en ambos grupos la mayoría fueron niños (71.4% en cada grupo), al igual hubo 2 gemelos en cada grupo (28.6%). En el peso al nacimiento en el grupo control en promedio pesaron 1471 gramos, mientras que el grupo 3-7 d el promedio fue de 1045 gramos y en el grupo ≥ 8 d ABT de 1002 gramos, se observa una tendencia a disminuir en este grupo a comparación del grupo control. Los

grupos de 3-7 d ATB y ≥ 8 d ABT pasaron más días en estancia hospitalaria (64 y 79 días respectivamente), sin embargo, no hubo diferencias estadísticas con respecto al grupo control. Los RN de la cohorte no tuvieron diferencias en el RCIU, peso y talla registrado al egreso de la estancia hospitalaria y el perímetro cefálico (Tabla 5). En cuanto a la nutrición los grupos 3-7 d ATB y ≥ 8 d ABT recibieron más días alimentación parenteral (17 y 18 días respectivamente) que el grupo control que recibió 9 días en promedio. La mayoría de los neonatos recibieron como alimentación leche humana y leche humana fortificada. El grupo ≥ 8 d ABT tardó más días en alcanzar los 150 mL/Kg/día por vía oral, tardando en promedio 19 días a comparación del grupo control y el grupo 3-7 d ABT de 11 y 12 días respectivamente.

En cuanto a los datos maternos en el grupo control el 33.3% tuvo un peso normal y el 66.6% sobrepeso; en el grupo 3-7 d ABT hubo un 28.6% de madres con peso normal, un 42.9% de madres con sobrepeso y un 28.6% con obesidad, en el grupo ≥ 8 d ABT hubo un 14.3% de madres con peso normal, un 57.1% de madres con sobrepeso y 28.6% con obesidad, no se observaron diferencias significativas entre grupos. Se observa que al menos hay una madre en cada grupo que presentó preeclampsia, en hipertensión el grupo control no presentó dicha patología, el grupo 3-7 d ABT hubo un 14.3% de incidencia, así como en el grupo ≥ 8 d ABT el 28.6%. En cuanto hipotiroidismo el grupo control hubo un 66.6% que presentaron dicha condición médica, el grupo 3-7 d ABT el 28.66% y el grupo ≥ 8 d ABT el 42.9%. Solo el grupo 3-7 d ABT y ≥ 8 d ABT presentaron el 14.3% de diabetes gestacional, y en la edad materna las madres oscilan entre 25 años en el grupo control, de 32 años en el grupo 3-7 d ABT y en 31 años en el grupo ≥ 8 d ABT En ninguna de estos parámetros antes descritos se observaron diferencias estadísticamente significativas.

No presentaron los neonatos prematuros sepsis temprana en ninguno de los grupos de estudio, pero en el grupo ≥ 8 d ABT hubo un 28.6% (2 neonatos) que presentaron sepsis tardía y choque séptico. Solamente en el grupo 3-7 d ABT el 28.6% presentó ECN., en el grupo 3-7 d ABT el 28.6% presentó neumonía por atípicos y en el grupo ≥ 8 d ABT el 71.4%. En cuanto a síndrome de dificultad respiratoria el grupo No ABT presentó un 66.6%, el grupo 3-7 d ABT un 71.4% y el grupo ≥ 8 d ABT un 85.7 que

fue casi la mayoría. También se observó para el grupo NO ABT un 33.3%, el grupo 3-7 d ABT un 71.4% y el grupo ≥ 8 d ABT un 85.7% en displasia broncopulmonar. En cuanto a la anemia el grupo No ABT no presentó ninguna madre con dicha patología, el grupo 3-7 d ABT un 28.6% y el grupo ≥ 8 d ABT un 85.7%, en este si observamos una diferencia estadística significativa, donde obtuvimos un valor de $p < 0.05$ ($p = 0.028$). Los neonatos que reciben más de 8 días antibióticos y presentan anemia se puede deber por su prematurez o deberse a otros factores que implican en la salud de estos neonatos prematuros. Se obtuvo en el grupo No ABT el 66.6%, en el grupo 3-7 d ABT un 14.3% y el grupo ≥ 8 d ABT 42.9% que presentaron conducto arterioso permeable, en cuanto a hiperbilirrubinemia se obtuvo en el grupo No ABT el 66.6%, en el grupo 3-7 d ABT un 71.4% y el grupo ≥ 8 d ABT 57.1%. En apnea el grupo No ABT presentó el 33.3%, en el grupo 3-7 d ABT un 28.6% y el grupo ≥ 8 d ABT 14.3%. En cuanto a la hemorragia intraventricular en el grupo No ABT presentaron el 33.3%, en el grupo 3-7 d ABT un 57.1% y el grupo ≥ 8 d ABT 71.4% Por último en el grupo No ABT no presentaron retinopatía del recién nacido, en el grupo 3-7 d ABT un 57.1% y el grupo ≥ 8 d ABT el 71.4%.

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

	No ABT (n=3)	3-7 días ABT (n=7)	≥ 8 días ABT (n=7)	p- Value
Datos de nacimiento y antropométricos				
SDG	32.2 \pm 1.3	29.3 \pm 1.7	27.7 \pm 1.7	0.0085** (a)
ABX Prenatal	3(100)	7 (100)	7 (100)	1
Cesárea (%)	2(66.7)	5 (71.4)	4 (57.1)	0.999
Género femenino (%)	3 (100)	2 (28.6)	2 (28.6)	0.156
Género masculino (%)	0 (0)	5 (71.4)	5 (71.4)	0.156
Único (%)	3 (100)	5(71.4)	5(71.4)	0.999
Múltiple (%)	0 (0)	2 (28.6)	2 (28.6)	0.999
Peso al nacimiento (g)	1471 \pm 164.2	1045 \pm 285.0	1002 \pm 278.5	0.0594
Días estancia hospitalaria	35 \pm 3.8	64 \pm 23.7	79 \pm 33.6	0.0914
APG al minuto	5 \pm 3.6	6 \pm 2.1	4 \pm 2.2	0.2436
APG al 5'	8 \pm 1.1	8 \pm 1.2	7 \pm 1.3	0.1745
Somatometría				
RCIU	0 (0)	2 (28.6)	1 (14.3)	1
Peso egreso	1937 \pm 127.9	2275 \pm 292.5	2516 \pm 531.6	0.1408
Talla egreso	43 \pm 1.4	44 \pm 2.4	45 \pm 3	0.3289
PC egreso	31 \pm 1.1	31 \pm 1.0	32 \pm 2.1	0.3991

Nutrición				
Días nutrición parenteral (NTP)	9 ± 6.9	17 ± 12.0	18 ± 8.4	0.4090
LH (%)	0 (0)	0 (0)	1 (14.3)	0.999
LH + LHF (%)	2 (66.7)	4 (57.1)	5 (71.4)	0.822
LH + LHF + F (%)	1 (33.3)	2 (28.6)	0 (0)	0.351
LH + F (%)	0 (0)	1 (14.3)	1 (14.3)	0.999
Día de vida 150 mL /Kg/ Día	11 ± 6.4	12 ± 3.9	19 ± 8.6	0.1290
Datos Maternos				
Peso normal	1 (33.3)	2 (28.6)	1 (14.3)	0.999
Sobrepeso	2 (66.6)	3 (42.9)	4 (57.1)	0.999
Obesidad	0 (0)	2 (28.6)	2 (28.6)	0.999
Preeclampsia	1 (33.3)	1 (14.3)	1 (14.3)	1
Hipertensión	0 (0)	1 (14.3)	2 (28.6)	1
Hipotiroidismo	2 (66.6)	2 (28.6)	3 (42.9)	0.811
Diabetes gestacional	0 (0)	1 (14.3)	1 (14.3)	0.999
Edad	25 ± 7.1	32 ± 5.2	31 ± 6.4	0.3505
Patologías neonato				
Sepsis temprana	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
Sepsis tardía	0 (0)	0 (0)	2 (28.6)	0.64
Choque séptico	0 (0)	0 (0)	2 (28.6)	0.64
ECN	0 (0)	2 (28.6)	0 (0)	0.64
Neumonía atípicos	0 (0)	2 (28.6)	5 (71.4)	0.156
SDR	2 (66.6)	5 (71.4)	6 (85.7)	0.999
Displasia broncopulmonar	1 (33.3)	5 (71.4)	6 (85.7)	0.311
Anemia	0 (0)	2 (28.6)	6 (85.7)	0.028*(b)
Conducto arterioso permeable	2 (66.6)	1 (14.3)	3 (42.9)	0.438
Hiperbilirrubinemia	2 (66.6)	5 (71.4)	4 (57.1)	0.999
Apnea	1 (33.3)	2 (28.6)	1 (14.3)	0.999
HIV (hemorragia intraventricular)	1 (33.3)	4 (57.1)	5 (71.4)	0.471
Retinopatía del recién nacido	0 (0)	4 (57.1)	5 (71.4)	0.176

SDG: Semanas de gestación; abx: antibiótico; RCIU: Retraso del crecimiento intrauterino; PC: perímetro cefálico; NTP; LH: Leche humana; LHF; Leche humana fortificada; F: fórmula láctea; ECN: Enterocolitis necrosante; SDR: Síndrome de dificultad respiratoria; HIV: hemorragia intraventricular. Una P<0.05 fue considerada estadísticamente significativa. (a): entre el grupo No ABT y; (b) entre grupo A1 y A3.

Después de realizar la extracción de ADN de las muestras de heces fecales, se realizó la purificación del oligonucleótido de V3-V4, después se realizó un análisis

de los productos de PCR a través de la metodología de electroforesis en gel de agarosa, donde se observan los productos de aproximadamente 500 pares de base.

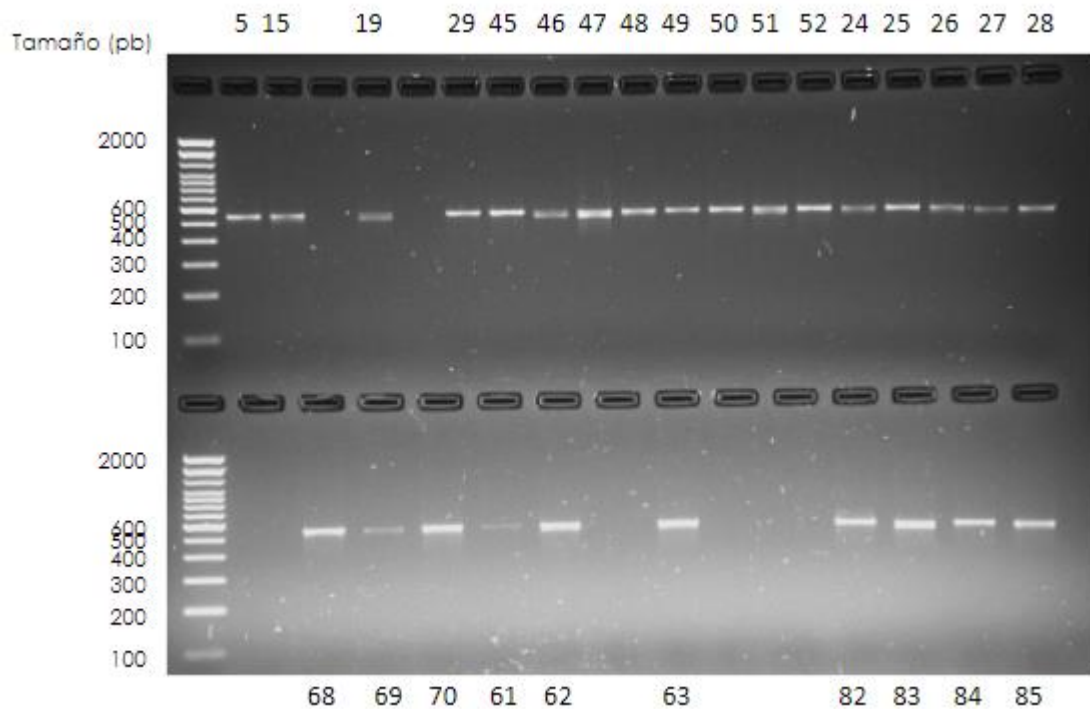


Figura 6. Productos de PCR de muestras de heces infantiles

Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se muestran los productos de PCR amplificados a partir de DNA extraído y purificado de heces infantiles con los oligonucleótidos de la región V3-V4 del ARNr 16S. A la izquierda del gel indica el marcador de pesos moleculares (M) en pares de bases.

11.1. Análisis de microbiota intestinal de neonatos prematuros mediante secuenciación de ARNr 16S

Después del análisis bioinformático con QIIME 2. Se obtuvieron las gráficas correspondientes a las abundancias relativas por Filo, Familia y Género. En cuanto a Filo (Figura 7) se observó que al nacimiento (1_1) una abundancia mayor de *Proteobacterias*, siguiendo de *Firmicutes* y se observó una abundancia menor de *Actinobacteria*, cercana al egreso (1_3) se observó un aumento de *Firmicutes* y una reducción de *Proteobacterias* y *Actinobacterias*, en el egreso (1_4) hay un ligero aumento de *Firmicutes* al igual que se vió ligeramente disminuido la abundancia de *Proteobacterias* y *Actinobacterias*, a los 6 meses (1_5) se observó mayor diversidad de filios, presenta *Bacteroidetes* en una abundancia mayor, mayor abundancia de

Actinobacterias y *Firmicutes* ha disminuido siendo el segundo filo más abundante después de *Proteobacterias*, a los 12 meses (1_6) presenta dominando *Proteobacterias*, y siendo muy similares *Firmicutes* y *Actinobacteria* y por último *Bacteroidetes*. Cuanto al grupo de 3-7 d ABT al nacimiento (2_1) se observa una dominancia de *Proteobacterias* y en menor cantidad abundancia de *Firmicutes*, en cuanto a cercana al nacimiento (2_2) se ve un ligero aumento de *Firmicutes*, observamos que cercana al egreso (2_3) continúa el aumento de *Firmicutes* y se comienza a apreciar la abundancia de *Actinobacterias*, al egreso (1_4) hay un aumento de *Firmicutes* y una reducción de *Proteobacterias*, a los 6 meses (2_5) existe una mayor abundancia de *Bacteroidetes* al igual que *Actinobacterias*, y a los 12 meses (2_6) hay aún mayor abundancia de *Bacteroidetes* y *Actinobacterias*. Por último en el grupo de estudio ≥ 8 d ABT, cercana al egreso (3_3) se aprecian más abundantes las *Proteobacterias*, seguidas de *Firmicutes* y en menor abundancia *Actinobacterias*, para el egreso (3_4) hay un aumento drástico en la abundancia de *Firmicutes*, muy similar al grupo de 3-7 d ABT, a los 6 meses (3_5) se observó la presencia de *Bacteroidetes* y mayor abundancia de *Actinobacterias*, a los 12 meses (1_6) se siguió observando este aumento de *Bacteroidetes*, observamos que hay un aumento de *Firmicutes* en comparación del grupo control donde predominan las *Proteobacterias* a este tiempo.

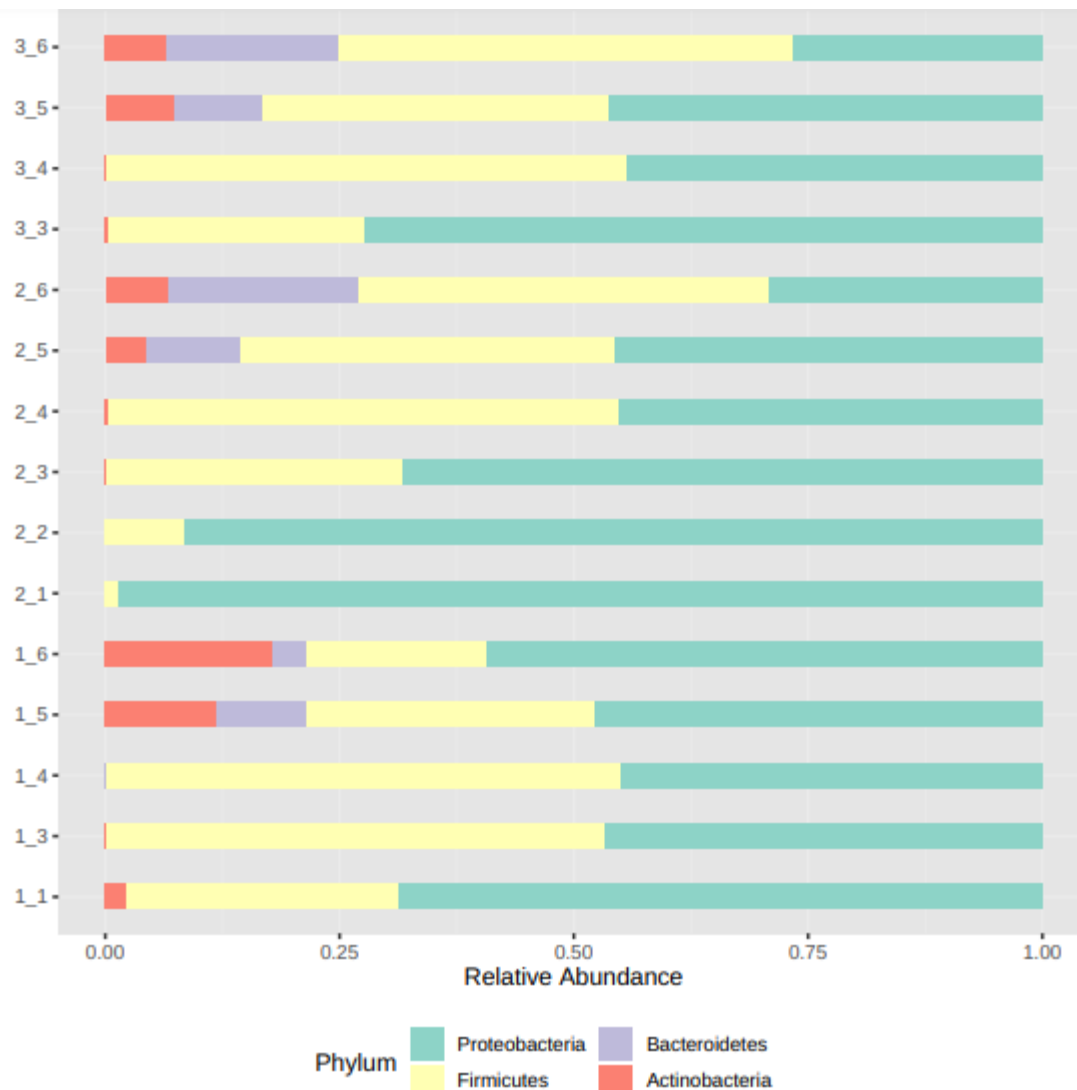


Figura 7. Composición taxonómica a nivel de filo

De muestras de secuencias de la región V3-V4 del gen codificante del 16S ARNr; en función de grupos de estudio y subdividido en temporalidad. El primer número corresponde a el grupo: (1) =No ABT, (2)= 3-7 d ABT y (3)= ≥ 8 d ABT. El segundo número corresponde a la temporalidad de la muestra: 1: al nacimiento, 2: cercana al nacimiento, 3: cercana al egreso, 4: egreso, 5: a los 6 meses y 6: a los 12 meses.

En cuanto a Familia (Figura 8) se observó que al nacimiento (1_1) existe una abundancia mayor de *Enterobacteriaceae* seguida por *Peptostreptococcaceae* y *Streptococcaceae*, cercana al egreso (1_3) se observó el aumento de *Clostridiaceae* y *Veillonellaceae*, al egreso (1_4) aumenta *Peptostreptococcaceae*, a los 6 meses (1_5) se observó una diversidad mayor al encontrar más familias como *Bacteroidaceae*, *Bifidobacteriaceae*, entre otras, para los 12 meses (1_6) se vió un

aumento de *Bifidobacteriaceae*, *Lachnospiraceae* y una disminución de *Clostridiaceae* y *Veillonellaceae* con respecto a los 6 meses. Para el grupo de 3-7 d ABT al nacimiento (2_1) la familia más abundante es *Enterobacteriaceae*, cercana al nacimiento (2_2) se vió un aumento en la abundancia de *Clostridiaceae* y *Enterococcaceae*, cercana al egreso (2_3) se apreció un aumento de *Veillonellaceae* y *Clostridiaceae*, al egreso (2_4) se vió un aumento de *Lachnospiraceae* y *Clostridiaceae* y una disminución de *Enterobacteriaceae*, a los 6 meses (2_5) se observó una mayor riqueza de familias, notándose *Veillonellaceae*, *Bacteroidaceae* y *Lachnospiraceae*, y a los 12 meses se vió un aumento de *Lachnospiraceae*, *Bacteroidaceae*, *Bifidobacteriaceae*, pero se ve en menor proporción que el grupo control esta última familia. Para el grupo ≥ 8 d ABT, cercana al egreso (3_3) se observa *Peptostreptococcaceae*, *Clostridiaceae* y *Enterobacteriaceae* en mayor proporción, para el egreso (3_4) se aprecia un aumento de *Clostridiaceae* y *Veillonellaceae*, a los 6 meses (3_5) hay un aumento de *Bifidobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* y una reducción drástica de *Clostridiaceae*, para los 12 meses (1_6) se aprecia un aumento de *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* y de *Veillonellaceae*.

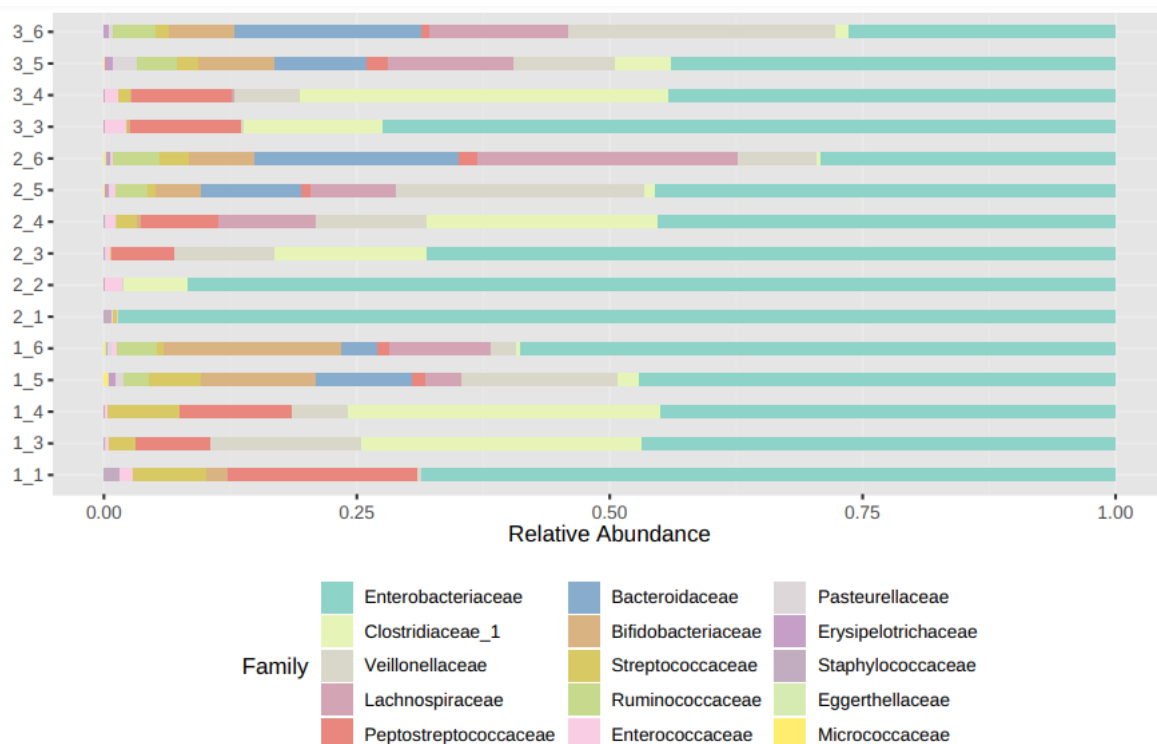


Figura 8. Composición taxonómica a nivel de familia

Composición taxonómica a nivel de familia de muestra de secuencias de la región V3-V4 del gen codificante del 16S ARNr; en función de grupos de estudio y

subdividido en temporalidad. El primer número corresponde a el grupo: (1) =No ABT, (2)= 3-7 d ABT y (3)=≥8 d ABT. El segundo número corresponde a la temporalidad de la muestra: 1: al nacimiento, 2: cercana al nacimiento, 3: cercana al egreso, 4: egreso, 5: a los 6 meses y 6: a los 12 meses.

En el gráfico de género (Figura 9) se observa una abundancia relativa al nacimiento (1_1) mayor de *Escherichia-Shigella* y *Klebsiella*, cercana al egreso (1_3) se observó el aumento de *Clostridium* y *Veillonella*, al egreso (1_4) aumentó aún más *Clostridium* y *Streptococcus*, a los 6 meses (1_5) se observó una diversidad mayor al encontrarse más géneros como *Bacteroides*, *Bifidobacterias* entre otras, para los 12 meses (1_6) se vió un aumento de *Bifidobacterias*, *Blautia*, y *Faecalibacterium*, también se observó una disminución de *Clostridium* y *Bacteroides*. Para el grupo de 3-7 d ABT al nacimiento (2_1) el género más abundante fue *Escherichia-Shigella* seguido por *Klebsiella* y *Enterobacter*, cercana al nacimiento (2_2) se vió un aumento en la abundancia de *Clostridium* y una disminución de *Klebsiella* en comparación del nacimiento, cercana al egreso (2_3) se apreció un aumento de *Veillonella* y *Clostridium*, al egreso (2_4) se vió un aumento aún más de *Clostridium* y una disminución de *Escherichia-Shigella*, a los 6 meses (2_5) se observó una mayor riqueza de familias, notándose *Bacteroides*, *Klebsiella*, *Veillonella* y *Faecalibacterium*, y a los 12 meses se vió un aumento de *Bacteroides*, *Bifidobacterium* aunque se observa menor abundancia con respecto al grupo control. Para el grupo ≥8 d ABT, cercana al egreso (3_3) se observó *Klebsiella*, *Clostridium* y *Escherichia-Shigella* en mayor proporción, para el egreso (3_4) se apreció un aumento de *Clostridium* y *Veillonella*, a los 6 meses (3_5) hubo un aumento de *Bifidobacterias*, *Bacteroides*, *Flavonifractor* y una reducción drástica de *Clostridium*, para los 12 meses (1_6) se apreció un aumento de *Bacteroides*, *Blautia* y de *Veillonella*.

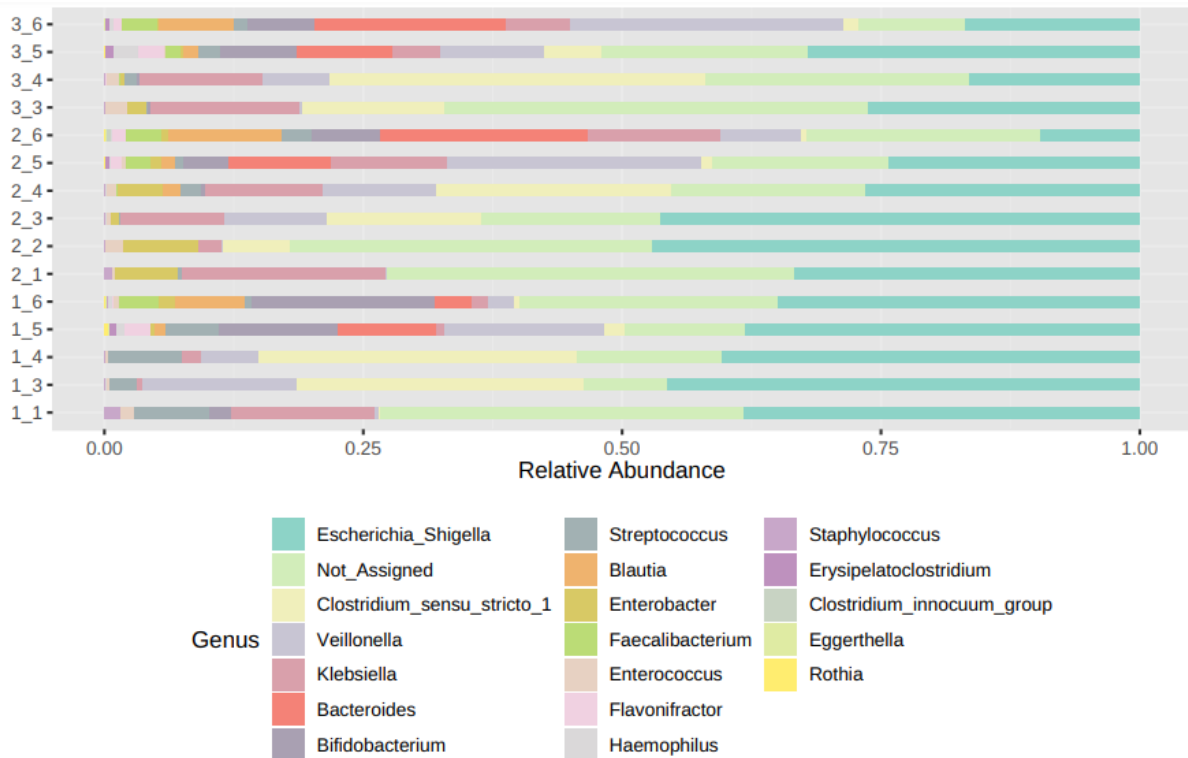


Figura 9. Composición taxonómica a nivel de género

Composición taxonómica a nivel de género de muestra de secuencias de la región V3-V4 del gen codificante del 16S ARNr; en función de grupos de estudio y subdividido en temporalidad. El primer número corresponde a el grupo: (1) = No ABT, (2) = 3-7 d ABT y (3) \geq 8 d ABT. El segundo número corresponde a la temporalidad de la muestra: 1: al nacimiento, 2: cercana al nacimiento, 3: cercana al egreso, 4: egreso, 5: a los 6 meses y 6: a los 12 meses.

Para evaluar los efectos de las alteraciones en la diversidad bacteriana se midió la riqueza bacteriana, la diversidad filogenética y la uniformidad en cada muestra. El uso de antibióticos no demostró cambios significativos entre grupos control y de tratamiento con antibióticos cercana al egreso, egreso, 6 meses y 12 meses. Pero la diversidad α fue aumentando conforme pasaba el tiempo y aunque no es estadísticamente significativo se observó una tendencia a disminuir esta diversidad al año del grupo 3 que fue tratado con más de 8 días de antibiótico con respecto a los demás, esto usando un análisis de Chao1, sin embargo, en los demás análisis de Shannon y Simpson esta tendencia no se observa. El análisis por Chao 1, nos indica una estimación de la abundancia de muestras.

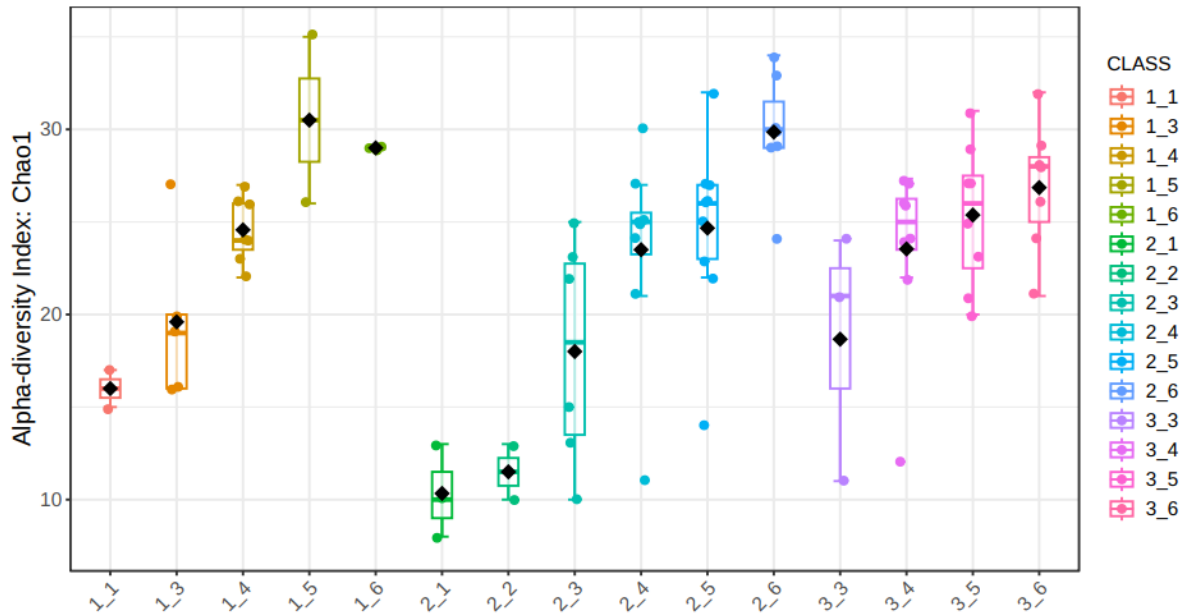


Figura 10. Análisis de diversidad α por Chao1

El análisis con Shannon cuantifica la incertidumbre al predecir la identidad de especies de un individuo. Valores menores a 2 se considera una baja diversidad, como observamos en todos nuestros grupos en temporalidades muy cercanas al nacimiento, pero al año de vida este valor esta entre 2 y 3 indicando una diversidad adecuada

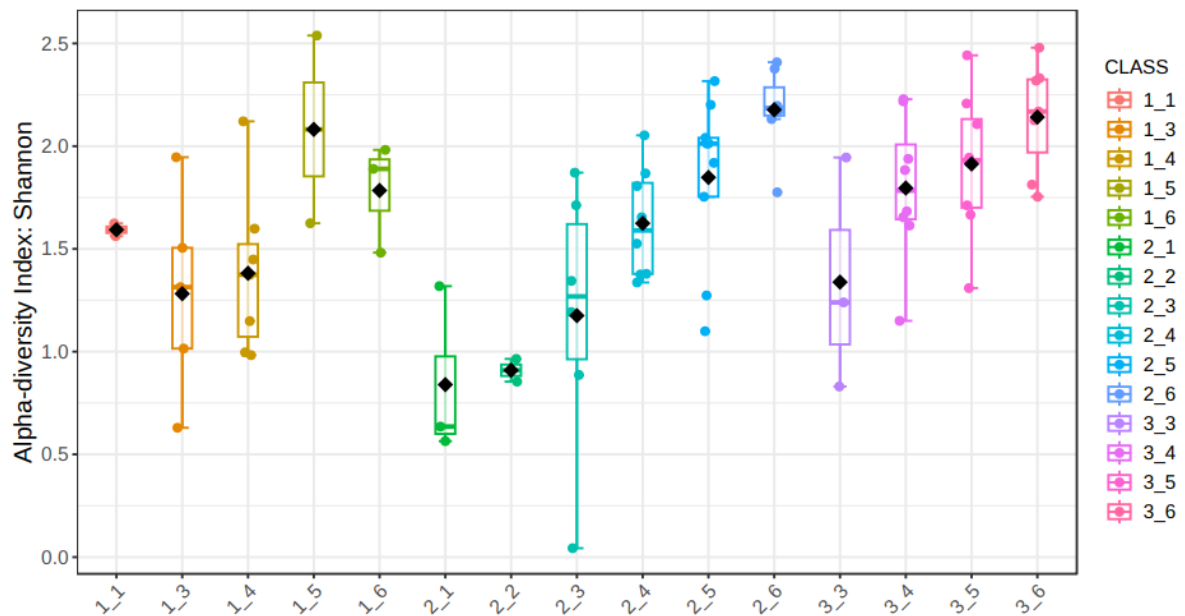


Figura 11. Análisis de diversidad α por Shannon

Análisis de diversidad alfa medido por la riqueza de especies de la comunidad y diversidad (número efectivo de especies de Shannon)

El análisis por Simpson es una medida de concentración, valores cercanos a 1 representan baja dominancia y valores cercanos a 0 una alta dominancia, observamos que los grupos a los 12 meses muestran una baja dominancia, indicando una diversidad más amplia en comparación de los cercanos al nacimiento que hay una dominancia más alta al acercarse más a 0.

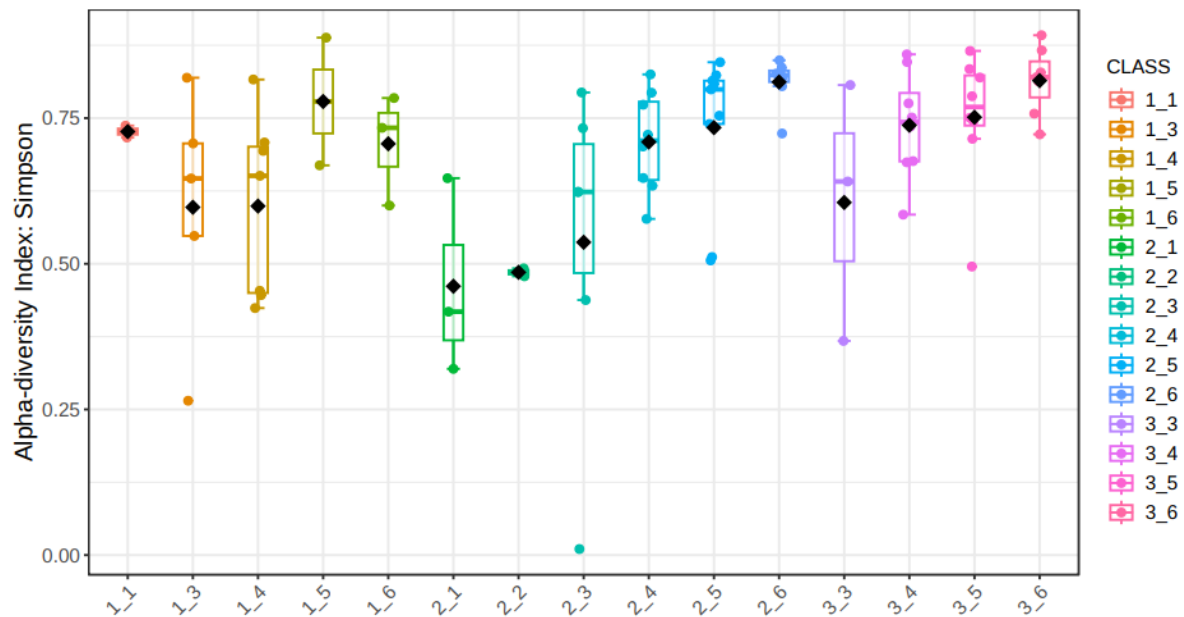


Figura 12. Análisis de diversidad α por Simpson.

Análisis de diversidad alfa medido por la riqueza de especies de la comunidad y diversidad (Simpson).

El análisis de la diversidad β mide las similitudes entre las muestras en función de la composición microbiana, donde evalúa las alteraciones que afectan la composición y la recuperación de un ecosistema microbiano completo. Se realizaron análisis de conjuntos de datos de ARNr 16S utilizando el algoritmo UniFrac. Este algoritmo evalúa la similitud entre las comunidades microbianas en función del grado de compartición de longitud de las ramas en un árbol de la vida bacteriana por parte de los taxones que las conforman.

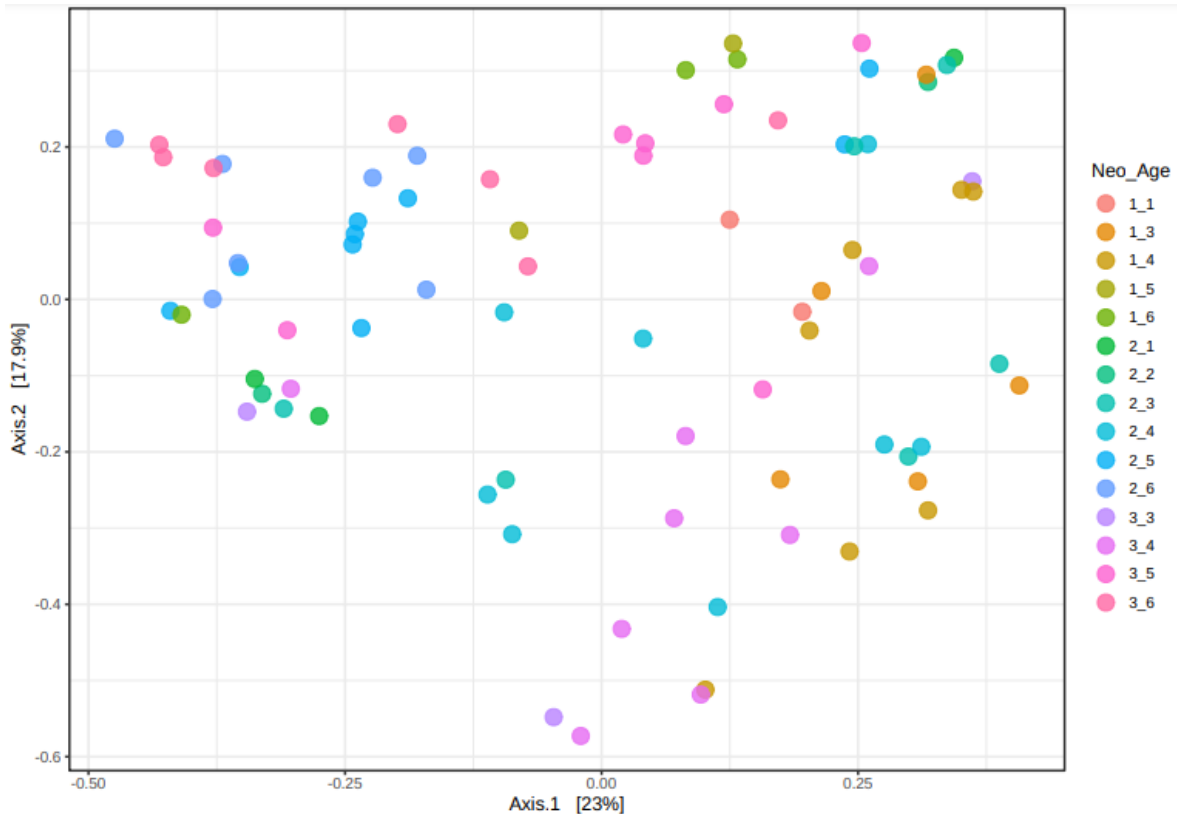


Figura 13. Análisis de diversidad β : componentes principales

Análisis de diversidad β de muestras calculando las distancias Unifrac ponderadas. Las muestras fueron codificadas por colores según al grupo y temporalidad.

La exposición a los antibióticos alteró significativamente la abundancia de diversos taxones bacterianos durante los primeros 12 meses de vida. Fundamentándose en el análisis LEfSe, los taxones que se muestran en la siguiente figura fueron significativamente más abundantes con respecto a los otros grupos ($P < 0.01$). Se observó en el grupo control que al nacimiento presenta más abundancia de *Streptococcus* y *Staphylococcus* y a los 6 meses un aumento de *Bifidobacterias*, *Faecalibacterium* y *Eggerthella*. En el grupo que recibió de 3 a 7 días de antibióticos a los 12 meses (2_6) se observó que existe un aumento de *Bacteroides*, *Blautia* y *Clostridium Innocuum Group*. Por último, en el grupo de más de 8 días de tratamiento con antibiótico, cercana al egreso hay un aumento de *Enterococcus*, al egreso hubo mayor abundancia de *Clostridium sensu stricto*, a los 6 meses presentó una mayor abundancia de *Haemophilus*, *Flavonifractor* y *Ersypelatoclostridium* y a los 12 meses de *Veillonella*.

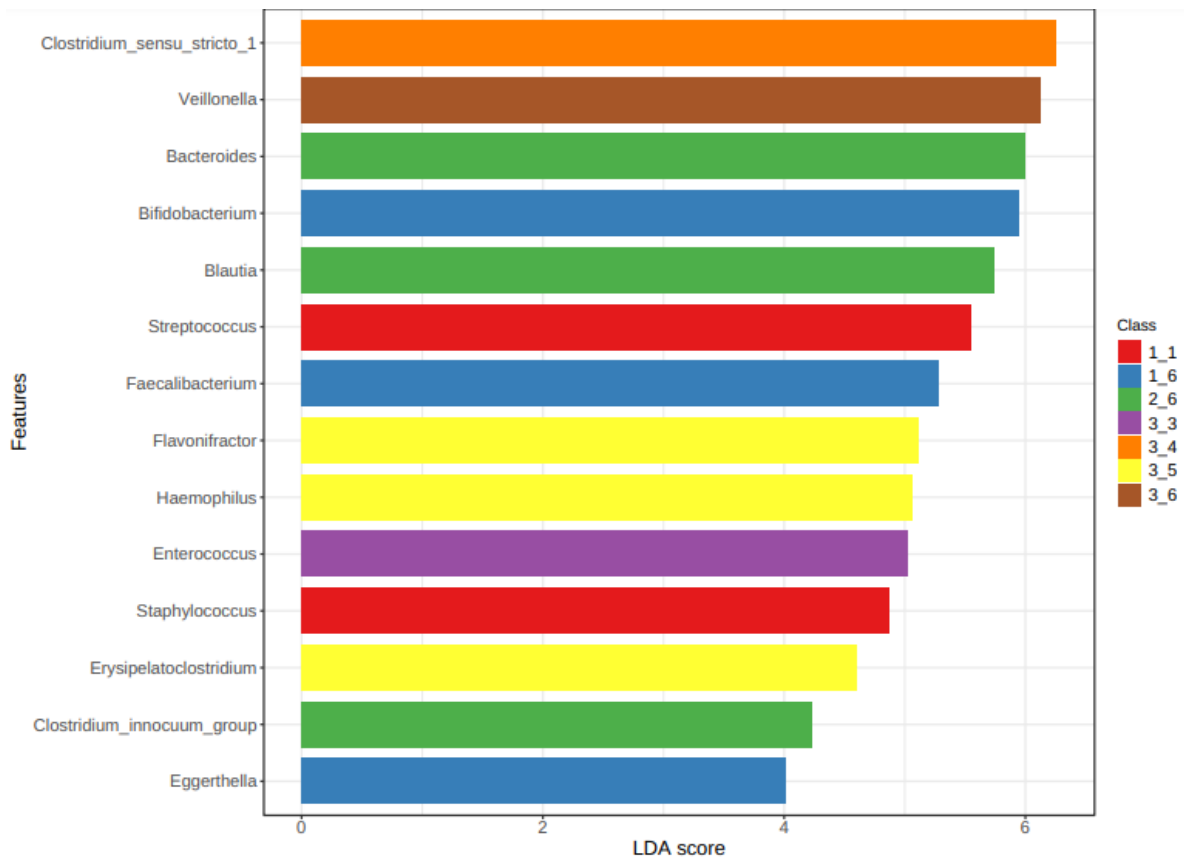


Figura 14. LEfSe

Se observan 14 clados taxonómicos diferencialmente abundantes ($\alpha = 0,01$) con una puntuación LDA superior a 4.

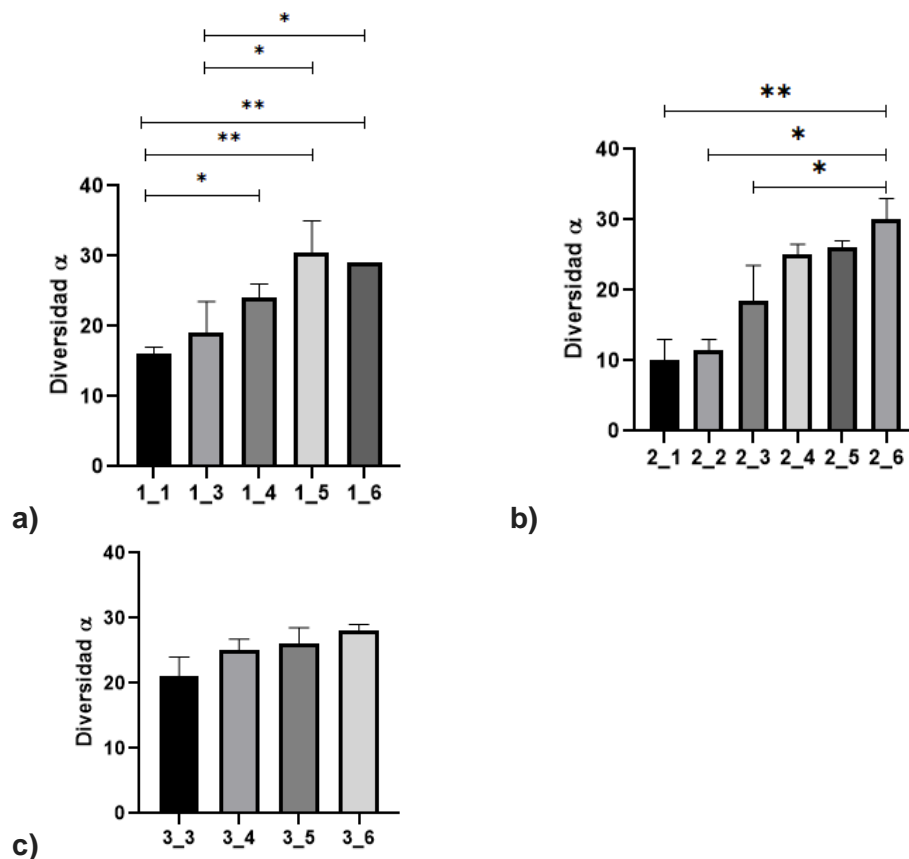


Figura 15. Diversidad α a través del tiempo: índice Chao1

a) Grupo sin tratamiento de antibióticos, 1_1 nacimiento, 1_3 cercana al egreso, 1_4 egreso, 1_5 a los 6 meses y 1_6 a los 12 meses. Se observa una diferencia estadísticamente significativa (por test Kruskal-Wallis) entre el nacimiento y el egreso ($p=0.0475$), entre el nacimiento y los 6 meses ($p= 0.0047$), entre el nacimiento y al año de vida ($p= 0.0055$), entre cercana al egreso y a los 6 meses ($p= 0.0114$), cercana al egreso y a los 12 meses ($p= 0.0125$). **b)** Grupo con tratamiento de antibióticos de 3 a 7 días, 2_1 nacimiento, 2_2 cercana al nacimiento, 2_3 cercana al egreso, 2_4 egreso, 2_5 a los 6 meses y 2_6 a los 12 meses. Se observa una diferencia estadísticamente significativa (por test Kruskal-Wallis) entre el nacimiento y a los 12 meses ($p=0.0044$) entre cercana al nacimiento y a los 12 meses ($p= 0.0468$) y entre cercana al egreso y a los 6 meses ($p= 0.0225$). **c)** Grupo con tratamiento de antibióticos ≥ 8 días, 3_3 cercana al egreso, 3_4 egreso, 3_5 a los 6 meses y 3_6 a los 12 meses (por test Kruskal-Wallis).

12. Discusión.

En este trabajo se analizó la abundancia relativa de bacterias en muestras de heces de neonatos prematuros que recibieron o no tratamiento con antibióticos para evaluar las posibles alteraciones de la M.I que se asocian al uso de estos medicamentos. Para ello, se utilizó la secuenciación del gen 16S ARNr, el cual nos permitió identificar los diferentes Filos, Familias y Géneros bacterianos presentes.

La M.I desempeña un papel importante en la salud humana, participando en la homeostasis, el sistema inmunológico y el metabolismo. Su desequilibrio se ha asociado con diversas enfermedades [1]. La composición y diversidad de la microbiota se ve influenciada por el tipo de alimentación en lactantes. Se ha observado que los lactantes alimentados con leche materna tienen una microbiota diferente a aquellos alimentados con fórmula, con una mayor presencia de *Bifidobacterias* en los primeros y de *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis* y *Lactobacilos* en los alimentados con fórmula [34].

En nuestro estudio de neonatos prematuros, se conformó una cohorte que incluyó tres grupos: un grupo control sin tratamiento con antibióticos después del nacimiento, y dos grupos de acuerdo con los días de antibiótico durante el periodo neonatal. Los grupos de estudio estuvieron conformados por 3 neonatos controles (grupo No ABT), 7 neonatos tratados con antibióticos de 3 a 7 días ABT y 6 neonatos tratados con antibióticos ≥ 8 días ABT. Existieron diferencias estadísticamente significativas en las SDG entre el grupo control y el ≥ 8 días ABT, mostrando que el grupo control son neonatos prematuros de moderado a tardío es decir de 32 a 37 SDG mientras que el grupo ≥ 8 días ABT son prematuros extremos o muy prematuros con una media de 27.7 SDG con desviación estándar de 1.7. Esto concuerda con los días de tratamiento del grupo ≥ 8 días ABT ya que está descrito que los prematuros extremos son más susceptibles a enfermedades infecciosas.

En cuanto al tipo de nacimiento no hubo diferencias estadísticas significativas entre grupos, así como en el género. En la dieta en todos los grupos la mayoría recibió una nutrición compuesta de leche humana más leche humana fortificada, lo que nos indica que estos infantes reciben prebióticos y probióticos provenientes de la leche materna como HMO y bacterias del género *Bifidobacterium* [25]; [38]. En cuestión de

datos maternos como sobrepeso, preeclampsia, hipertensión, hipotiroidismo, diabetes gestacional no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

De nuestros pacientes en el grupo ≥ 8 d ABT existieron 2 neonatos que presentaron sepsis tardía, 2 con choque séptico, 5 que presentaron neumonía por atípicos, 6 con SDR. En cuanto al grupo 3 a 7 días ABT presentaron 2 neonatos ECN, 2 neumonía por atípicos, 5 con SDR. En el grupo control 2 neonatos presentaron solamente síndrome de dificultad respiratoria pero ninguna enfermedad infecciosa. En cuanto a la anemia si se vieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo ≥ 8 d ABT donde se observa que la anemia es más frecuente en el grupo grupo ≥ 8 d ABT con un 85.7% y en el grupo control es nulo. En estudios se describe que los recién nacidos prematuros al presentar riñones inmaduros no pueden producir suficiente eritropoyetina (EPO) lo que provoca una anemia del prematuro (AOP, del inglés Anemia of prematurity), la EPO es una hormona esencial para la producción de eritrocitos [93].

En muchas situaciones, los médicos comienzan un tratamiento empírico con antibióticos cuando hay sospecha o riesgo de infección, incluso si se realizan cultivos bacterianos, en ocasiones no se logra aislar el agente causal debido a la dificultad de cultivar ciertas bacterias. En estos casos, se recurre a métodos de diagnóstico molecular, como la detección de ADN bacteriano mediante PCR, para lograr un diagnóstico preciso y efectivo. Los esquemas utilizados fueron combinaciones de AMP/AMK, que se emplean como profilaxis en casos de sospecha de sepsis relacionada con infecciones maternas previas y en casos de sepsis neonatal temprana, que ocurre durante las primeras 72 horas después del nacimiento. Nuestros resultados mostraron que en infantes prematuros que recibieron un tratamiento de 3-7 días de antibióticos hay una mayor abundancia de *Bacteroides*, *Blautia* y *Clostridium* a comparación de los demás grupos.

La sepsis neonatal temprana se produce cuando las bacterias se transmiten verticalmente de la madre al recién nacido. En estos casos, se implementa una terapia antibiótica empírica temprana que puede salvar la vida de los neonatos. Sin embargo, esta terapia también puede tener efectos perjudiciales al aumentar el riesgo de sepsis o enterocolitis necrotizante (ECN). Esto se debe al aumento de la presión selectiva de los antibióticos, que puede provocar la pérdida de diversidad

bacteriana en el intestino y el aumento de la presencia de patógenos multidrogo resistentes (MDR)

Se utilizó otro esquema denominado P/TZP/VAN, el cual se emplea en casos de sepsis tardía que ocurre después de las primeras 72 horas de vida, así como en neonatos con enterocolitis necrosante. Además, otros esquemas pueden utilizarse como MEM (Meropenem), CLR (claritromicina), AZT (azitromicina). El uso de MEM está indicado principalmente cuando se detecta la presencia de bacterias productoras de BLEE (β -lactamasas de espectro extendido) en los cultivos bacterianos, así como en casos de choque séptico. Por su parte, CLR se administra cuando el neonato presenta neumonía causada por agentes atípicos. La azitromicina se administra para tratar infecciones bacterianas como bronquitis o neumonía

En un estudio realizado por Chernikova y colaboradores en 2018 describen que la familia bacteriana dominante identificada en muestras de heces de lactantes prematuros fue *Enterobacteriaceae* representando un 32% de las lecturas normalizadas, estudio que realizaron con secuenciación del ARNr 16S región V3-V4 [61], lo que empató los resultados de nuestra cohorte de neonatos prematuros que presentan en todos los grupos y todas las temporalidades una mayor proporción de *Enterobacteriaceae*.

Nuestros resultados revelan sobre la abundancia relativa de bacterias, inicialmente con el grupo control al nacimiento observamos diferencias significativas en cuanto a la abundancia que es mayor de *Streptococcus* y *Staphylococcus* conforme a los otros grupos. Chernikova describe que la proporción de *Staphylococcus* es del 6% en infantes pretérmino y conforme a nuestros resultados el grupo control empata con esta aseveración, pero también se observa que esta cantidad va disminuyendo en los grupos tratados con antibióticos [61]

También observamos que este grupo control que no recibió antibióticos a los 12 meses existe una diferencia significativa en mayor abundancia con *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* y *Eggerthella* con respecto a los grupos de 3-7 d ABT y ≥ 8 d ABT. Uzan y colaboradores en 2021 describen en un estudio de neonatos a término sobre la exposición de antibióticos y la perturbación de la M.I indican que en el grupo tratado con antibióticos hay un aumento en la abundancia relativa de *Blautia* a

comparación del grupo control, donde se observa mayor abundancia de *Bifidobacterias* [94].

Las bifidobacterias se asocian a múltiples beneficios en la salud del infante, y se ha demostrado que la ausencia de esta se asocia a un aumento de riesgo de desarrollo de alergias y asma [95], además se ha sugerido que compromete la función inmune, volviéndose más susceptible a enfermedades infecciosas [47].

Según nuestro informe, en el grupo 3-7 días tratado con antibióticos, se demostró una diferencia estadísticamente significativa en la abundancia a los 12 meses. En este grupo, se encontró un aumento en la presencia de *Bacteroides*, *Blautia* y *Clostridium innocuum*. Sin embargo, otro estudio realizado por Chernikova y sus colegas en 2018 describió que el uso de antibióticos en recién nacidos, especialmente en lactantes prematuros, se asoció con una menor abundancia de *Bifidobacterium* y *Bacteroides*. Este estudio se llevó a cabo en una cohorte de 206 lactantes, y las muestras se analizaron a partir de las 6 semanas de vida extrauterina [61]. Empatando a nuestros hallazgos, en los grupos tratados con antibióticos, se demostró una menor abundancia tanto de *Bifidobacterium* como de *Bacteroides* al momento del egreso.

Se ha estudiado y se sospecha que el aumento de algunas especies de *Clostridium* como *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium neonatale* se ve relacionado con un aumento en la incidencia de ECN [96].

En el grupo ≥ 8 d ABT en una edad cercana al egreso observamos mayor presencia de *Enterococcus*, empatando nuestros resultados con un estudio realizado en recién nacidos prematuros de peso muy bajo al nacer tratados con antibióticos se evaluaron los perfiles de la M.I donde hallaron que en el grupo de tratamiento de antibiótico por 7 días las especies de *Enterococcus* fueron significativamente más abundantes [97].

Al egreso en el grupo ≥ 8 d ABT observamos un aumento en la abundancia de *Clostridium sensu stricto 1* conforme a los demás grupos de estudio. Xu y colaboradores en el 2022 reportan en su estudio que la abundancia es mayor de *Clostridium* en neonatos prematuros que no fueron tratados con antibióticos a las 3 semanas en comparación a la semana de vida extrauterina [98], en comparación con nuestro estudio este aumento de la abundancia de *Clostridium* denota que en

lactantes que se les administró antibióticos o no van a tener un aumento en la abundancia de *Clostridium* en el tiempo de 3 semanas y hasta el egreso y después en el tiempo este irá disminuyendo a los 6 meses.

A los 6 meses en el grupo tratado más de 8 días con antibióticos hay una diferencia significativa sobre el aumento en la abundancia de *Haemophilus*, *Flavonifractor*, y *Erysipelatoclostridium* con respecto a los demás grupos. En el estudio de Bokulich y colaboradores, se encontró que la exposición neonatal a antibióticos aumenta la abundancia de la clase de *Clostridiales* en la microbiota intestinal infantil a los 12 meses [99].

Hill y colaboradores en el 2017 reportan una abundancia de *Haemophilus* en grupos de neonatos pretérmino [100] en nuestro estudio observamos un aumento en la abundancia siendo una diferencia estadísticamente significativa conforme a los otros grupos de estudio, empatando nuestros hallazgos. Al año se observa un aumento de *Veillonella* en el grupo ≥ 8 d ABT, esto se ha reportado que en los neonatos prematuros que recibieron un tratamiento de antibiótico después de los 12 meses comienza a aumentar la abundancia de esta bacteria en la microbiota intestinal [99]

Un estudio elaborado por Bubser y colaboradores de tipo retrospectivo, analizaron 1407 lactantes prematuros con edad gestacional menor a las 32 SDG nacidos en Alemania, se les administró antibióticos en la primera semana postnatal, descubrieron que la exposición temprana a los antibióticos no afecta el riesgo de colonización con organismos resistentes a múltiples fármacos (MDRO por sus siglas en inglés) y patógenos altamente epidémicos en lactantes prematuros.

La diversidad bacteriana va aumentando con la edad. Observamos que la diversidad alfa aumenta conforme aumenta la edad de los lactantes en cada uno de nuestros grupos estudiados. En un estudio de 40 neonatos prematuros y con un peso muy bajo al nacer que recibieron tratamiento con antibióticos, se analizó la M.I de heces, a través de secuenciación de amplicones que cubren la región V3 generada con cebadores optimizados, los neonatos prematuros albergan una proporción relativa mayor de *Firmicutes* al nacimiento, y de *Proteobacteria* posteriormente [101]. En nuestro estudio la diversidad alfa no se ve alterada de manera estadísticamente significativa entre el grupo control y los grupos tratados con antibióticos comparados

en cada edad, pero si se observa una disminución de Bifidobacterium en los grupos tratados con antibióticos y un aumento en Klebsiella

13. Conclusiones

Encontramos una asociación entre el uso prolongado de antibióticos con una menor cantidad en la abundancia de *Bifidobacterium* y una mayor abundancia de *Enterococcus*, *Clostridium*, *Haemophilus* y *Veillonella* en lactantes prematuros tratados con antibióticos en comparación con los lactantes prematuros que no recibieron antibióticos. Aunque no observamos que la diversidad alfa bacteriana fuera significativamente diferente entre grupos en los distintos tiempos, si se observa que aumenta esta diversidad alfa con el aumento de la edad del infante. Según nuestros hallazgos, sugerimos que la administración de antibióticos en lactantes prematuros conlleva a cambios en la composición de la microbiota intestinal.

14. Referencias

1. Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2018;36: 241–245.
2. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*. 2016;352: 539–544.
3. Establishing What Constitutes a Healthy Human Gut Microbiome: State of the Science, Regulatory Considerations, and Future Directions. *J Nutr*. 2019;149: 1882–1895.
4. Tarracchini C, Milani C, Longhi G, Fontana F, Mancabelli L, Pintus R, et al. Unraveling the Microbiome of Necrotizing Enterocolitis: Insights in Novel Microbial and Metabolomic Biomarkers. *Microbiology Spectrum*. 2021 [cited 30 Jun 2023]. doi:10.1128/Spectrum.01176-21
5. Wandro S, Osborne S, Enriquez C, Bixby C, Arrieta A, Whiteson K. The Microbiome and Metabolome of Preterm Infant Stool Are Personalized and Not Driven by Health Outcomes, Including Necrotizing Enterocolitis and Late-Onset Sepsis. *mSphere*. 2018 [cited 30 Jun 2023]. doi:10.1128/msphere.00104-18
6. Li N, Yang J, Zhang J, Liang C, Wang Y, Chen B, et al. Correlation of Gut Microbiome Between ASD Children and Mothers and Potential Biomarkers for Risk Assessment. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2019;17: 26–38.
7. Boonchooduang N, Louthrenoo O, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Possible links between gut–microbiota and attention-deficit/hyperactivity disorders in children and adolescents. *Eur J Nutr*. 2020;59: 3391–3403.
8. Kim H, Sitarik AR, Woodcroft K, Johnson CC, Zoratti E. Birth Mode, Breastfeeding, Pet Exposure, and Antibiotic Use: Associations With the Gut Microbiome and Sensitization in Children. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2019;19: 22.
9. Muscogiuri G, Cantone E, Cassarano S, Tuccinardi D, Barrea L, Savastano S, et al. Gut microbiota: a new path to treat obesity. *Int J Obes Suppl*. 2019;9: 10–19.
10. Russell JT, Roesch LFW, Ördberg M, Ilonen J, Atkinson MA, Schatz DA, et al. Genetic risk for autoimmunity is associated with distinct changes in the human gut microbiome. *Nat Commun*. 2019;10: 3621.
11. Baranowski JR, Claud EC. Necrotizing Enterocolitis and the Preterm Infant Microbiome. *Probiotics and Child Gastrointestinal Health*. 2019; 25–36.
12. Shekhar S, Petersen FC. The Dark Side of Antibiotics: Adverse Effects on the Infant Immune Defense Against Infection. *Front Pediatr*. 2020;8: 544460.
13. Microbiota autóctona. [cited 30 Jun 2023]. Available: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-X0213932417608739>
14. Eisenstein M. The skin microbiome. *Nature*. 2020;588: S209–S209.

15. Pammi M, Cope J, Tarr PI, Warner BB, Morrow AL, Mai V, et al. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Microbiome*. 2017;5: 31.
16. Soeorg H, Huik K, Parm Ü, Ilmoja M-L, Metsvaht T, Lutsar I. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in neonatal intensive care units. *APMIS*. 2017;125: 63–73.
17. Dong Y, Speer CP, Glaser K. Beyond sepsis: *Staphylococcus epidermidis* is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. *Virulence*. 2018 [cited 7 Jul 2023]. doi:10.1080/21505594.2017.1419117
18. Got bacteria? The astounding, yet not-so-surprising, microbiome of human milk. *Curr Opin Biotechnol*. 2017;44: 63–68.
19. Zimmermann P, Curtis N. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *J Infect*. 2020;81: 17–47.
20. Moossavi S, Sepehri S, Robertson B, Bode L, Goruk S, Field CJ, et al. Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. *Cell Host Microbe*. 2019;25: 324–335.e4.
21. Selway CA, Collins CT, Makrides M, Sullivan TR, Weyrich LS. Variable preterm oral microbiome stabilizes and reflects a full-term infant profile within three months. *Pediatr Res*. 2023; 1–9.
22. de Heredia B, Rosario M. Microbiota autóctona. *Farmacia Profesional*. 2017;31: 17–21.
23. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19: 55–71.
24. Muñoz-Garach A, Diaz-Perdigones C, Tinahones FJ. Gut microbiota and type 2 diabetes mellitus. *Endocrinol Nutr*. 2016;63: 560–568.
25. Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L, Armanini F, Turroni F, James K, et al. Maternal inheritance of bifidobacterial communities and bifidophages in infants through vertical transmission. *Microbiome*. 2017;5: 1–13.
26. Larson PJ, Zhou W, Santiago A, Driscoll S, Fleming E, Voigt AY, et al. Associations of the skin, oral and gut microbiome with aging, frailty and infection risk reservoirs in older adults. *Nature Aging*. 2022;2: 941–955.
27. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2: 31601.
28. Sim K, Powell E, Cornwell E, Simon Kroll J, Shaw AG. Development of the gut microbiota during early life in premature and term infants. *Gut Pathog*. 2023;15: 1–16.
29. *Nutrición Hospitalaria* - Arán Ediciones, S.L. [cited 17 May 2023]. Available: <https://www.nutricionhospitalaria.org/articles/01573/show>

30. Manrique Vergara D, González Sánchez ME. [Short chain fatty acids (butyric acid) and intestinal diseases]. *Nutr Hosp.* 2017;34: 58–61.
31. Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature.* 2016;535: 56–64.
32. Sun L-J, Li J-N, Nie Y-Z. Gut hormones in microbiota-gut-brain cross-talk. *Chin Med J .* 2020;133: 826.
33. Palmeira P, Carneiro-Sampaio M. Immunology of breast milk. *Rev Assoc Med Bras.* 2016;62: 584–593.
34. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int.* 2017;66: 515–522.
35. Jiang M, Li Z, Zhang F, Li Z, Xu D, Jing J, et al. Butyrate inhibits iILC2-mediated lung inflammation via lung-gut axis in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *BMC Pulm Med.* 2023;23: 1–14.
36. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14: 491–502.
37. Martyniak A, Medyńska-Przęczek A, Wędrychowicz A, Skoczeń S, Tomasik PJ. Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Paraprobiotics and Postbiotic Compounds in IBD. *Biomolecules.* 2021;11. doi:10.3390/biom11121903
38. Walsh C, Lane JA, van Sinderen D, Hickey RM. Human milk oligosaccharide-sharing by a consortium of infant derived *Bifidobacterium* species. *Sci Rep.* 2022;12: 1–14.
39. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11: 506–514.
40. Tytgat HLP, Douillard FP, Reunanen J, Rasinkangas P, Hendrickx APA, Laine PK, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG Outcompetes *Enterococcus faecium* via Mucus-Binding Pili: Evidence for a Novel and Heterospecific Probiotic Mechanism. *Appl Environ Microbiol.* 2016 [cited 30 Jun 2023]. doi:10.1128/AEM.01243-16
41. Ma B, Gavzy SJ, Saxena V, Song Y, Piao W, Lwin HW, et al. Strain-specific alterations in gut microbiome and host immune responses elicited by tolerogenic *Bifidobacterium pseudolongum*. *Sci Rep.* 2023;13: 1–18.
42. Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, Hutkins R. Probiotics for human use. *Nutr Bull.* 2018;43: 212–225.
43. Sung V, D’Amico F, Cabana MD, Chau K, Koren G, Savino F, et al. to Treat Infant Colic: A Meta-analysis. *Pediatrics.* 2018;141. doi:10.1542/peds.2017-1811

44. Depoorter L, Vandenplas Y. Probiotics in Pediatrics. A Review and Practical Guide. *Nutrients*. 2021;13. doi:10.3390/nu13072176
45. Pathogenesis of NEC: Role of the innate and adaptive immune response. *Semin Perinatol*. 2017;41: 15–28.
46. Sharif S, Meader N, Oddie SJ, Rojas-Reyes MX, McGuire W. Probiotics to prevent necrotising enterocolitis in very preterm or very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;10: CD005496.
47. Laursen MF, Sakanaka M, von Burg N, Mörbe U, Andersen D, Moll JM, et al. Bifidobacterium species associated with breastfeeding produce aromatic lactic acids in the infant gut. *Nature Microbiology*. 2021;6: 1367–1382.
48. KC. Bifidobacteria in the infant gut use human milk oligosaccharides: how does this lead to health benefits? In: International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) [Internet]. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics; 24 Jun 2022 [cited 17 Jul 2023]. Available: <https://isappscience.org/bifidobacteria-in-the-infant-gut-use-human-milk-oligosaccharides-how-does-this-lead-to-health-benefits/>
49. Preterm birth. [cited 17 May 2023]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>
50. Reyman M, van Houten MA, Watson RL, Chu MLJN, Arp K, de Waal WJ, et al. Effects of early-life antibiotics on the developing infant gut microbiome and resistome: a randomized trial. *Nat Commun*. 2022;13: 1–12.
51. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315: 801–810.
52. Celik IH, Hanna M, Canpolat FE, Pammi M. Diagnosis of neonatal sepsis: the past, present and future. *Pediatr Res*. 2021;91: 337–350.
53. Icaza-Chávez ME. [Gut microbiota in health and disease]. *Rev Gastroenterol Mex*. 2013;78: 240–248.
54. Virta L, Auvinen A, Helenius H, Huovinen P, Kolho K-L. Association of Repeated Exposure to Antibiotics With the Development of Pediatric Crohn’s Disease—A Nationwide, Register-based Finnish Case-Control Study. *Am J Epidemiol*. 2012;175: 775–784.
55. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep*. 2016;6: 1–13.
56. Kuperman AA, Koren O. Antibiotic use during pregnancy: how bad is it? *BMC Med*. 2016;14: 1–7.
57. Willyard C. Could baby’s first bacteria take root before birth? *Nature*. 2018;553: 264–266.

58. Walker WA. The importance of appropriate initial bacterial colonization of the intestine in newborn, child, and adult health. *Pediatr Res.* 2017;82: 387–395.
59. de Goffau MC, Lager S, Sovio U, Gaccioli F, Cook E, Peacock SJ, et al. Author Correction: Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature.* 2019;574: E15–E15.
60. Theis KR, Romero R, Winters AD, Greenberg JM, Gomez-Lopez N, Alhousseini A, et al. Does the human placenta delivered at term have a microbiota? Results of cultivation, quantitative real-time PCR, 16S rRNA gene sequencing, and metagenomics. *Am J Obstet Gynecol.* 2019;220: 267.e1–267.e39.
61. Chernikova DA, Madan JC, Housman ML, Zain-ul-abideen M, Lundgren SN, Morrison HG, et al. The premature infant gut microbiome during the first 6 weeks of life differs based on gestational maturity at birth. *Pediatr Res.* 2018;84: 71–79.
62. Wampach L, Heintz-Buschart A, Fritz JV, Ramiro-Garcia J, Habier J, Herold M, et al. Birth mode is associated with earliest strain-conferred gut microbiome functions and immunostimulatory potential. *Nat Commun.* 2018;9: 1–14.
63. Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med.* 2016;22: 250–253.
64. Reyman M, van Houten MA, van Baarle D, Bosch AATM, Man WH, Chu MLJN, et al. Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nat Commun.* 2019;10: 1–12.
65. Combellick JL, Shin H, Shin D, Cai Y, Hagan H, Lacher C, et al. Differences in the fecal microbiota of neonates born at home or in the hospital. *Sci Rep.* 2018;8: 15660.
66. Shin H, Pei Z, Martinez KA, Rivera-Vinas JI, Mendez K, Cavallin H, et al. Erratum to: The first microbial environment of infants born by C-section: the operating room microbes. *Microbiome.* 2016;4: 1–1.
67. Zhu D, Xiao S, Yu J, Ai Q, He Y, Cheng C, et al. Effects of One-Week Empirical Antibiotic Therapy on the Early Development of Gut Microbiota and Metabolites in Preterm Infants. *Sci Rep.* 2017;7: 1–10.
68. Análisis por PCR en tiempo real de alteraciones en la microbiota intestinal...: Discovery Service para UNAM. [cited 7 Jul 2023]. Available: <https://eds.s.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=5&sid=280aebc2-8edd-4186-8890-a425812d672d%40redis&bdata=Jmxhbm9ZXMmc2l0ZT1lZHMtbGl2ZQ%3d%3d#db=cat02029a&AN=tes.TES01000788094>
69. Ampicillin. [cited 30 Jun 2023]. Available: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00415>
70. Amikacin. [cited 30 Jun 2023]. Available: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00479>

71. Piperacillin. [cited 30 Jun 2023]. Available: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00319>
72. Tazobactam. [cited 7 Jul 2023]. Available: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01606>
73. Vancomycin. [cited 30 Jun 2023]. Available: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00512>
74. Meropenem. [cited 30 Jun 2023]. Available: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00760>
75. Clarithromycin. [cited 30 Jun 2023]. Available: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01211>
76. Investigación RS. Diagnóstico y tipos de PCR. Revisión bibliográfica. In: ▷ RSI - Revista Sanitaria de Investigación [Internet]. 2 Aug 2021 [cited 30 Jun 2023]. Available: <https://revistasanitariadeinvestigacion.com/diagnostico-y-tipos-de-pcr-revision-bibliografica/>
77. Polymerase chain reaction (PCR) method. [cited 7 Jul 2023]. Available: https://searchworks-lb.stanford.edu/articles/ers__94417072
78. D'Amore R, Ijaz UZ, Schirmer M, Kenny JG, Gregory R, Darby AC, et al. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics*. 2016;17: 1–20.
79. Naik T, Sharda M, C P L, Virbhadra K, Pandit A. High-quality single amplicon sequencing method for illumina MiSeq platform using pool of “N” (0–10) spacer-linked target specific primers without PhiX spike-in. *BMC Genomics*. 2023;24: 1–11.
80. Rubio S, Pacheco-Orozco RA, Gómez AM, Perdomo S, García-Robles R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Univ Med*. 2020;61. doi:10.11144/Javeriana.umed61-2.sngs
81. Straub D, Blackwell N, Langarica-Fuentes A, Peltzer A, Nahnsen S, Kleindienst S. Interpretations of Environmental Microbial Community Studies Are Biased by the Selected 16S rRNA (Gene) Amplicon Sequencing Pipeline. *Front Microbiol*. 2020;11: 550420.
82. Callahan BJ, Wong J, Heiner C, Oh S, Theriot CM, Gulati AS, et al. High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Res*. 2019;47: e103–e103.
83. Microbiome Informatics: OTU vs. ASV. In: Zymo Research International [Internet]. [cited 7 Jul 2023]. Available: <https://zymoresearch.eu/blogs/blog/microbiome-informatics-otu-vs-asv>
84. Shade A. Diversity is the question, not the answer. *ISME J*. 2016;11: 1–6.

85. Baselga A, Rodríguez CG. Diversidad alfa, beta y gamma: ¿cómo medimos diferencias entre comunidades biológicas? *Nova Acta Cient Compostelana* . 2019;26. Available: <https://revistas.usc.gal/index.php/nacc/article/view/6413>
86. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13: 581–583.
87. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37: 852–857.
88. Chao A, Chiu C. Nonparametric Estimation and Comparison of Species Richness. 2016 [cited 17 May 2023]. doi:10.1002/9780470015902.A0026329
89. 10.1: Introducción, índice de Simpson e índice Shannon-Weiner. In: LibreTexts Español [Internet]. Libretexts; 31 Oct 2022 [cited 30 Jun 2023]. Available: [https://espanol.libretexts.org/Estadisticas/Estadistica_Aplicada/Libro%3A_Biometria_de_Recursos_Naturales_\(Kiernan\)/10%3A_Medidas_cuantitativas_de_diversidad%2C_similitud_de_sitios_e_idoneidad_del_h%C3%A1bitat/10.01%3A_Introducci%C3%B3n%2C_%C3%ADndice_de_Simpson_e_%C3%ADndice_Shannon-Weiner](https://espanol.libretexts.org/Estadisticas/Estadistica_Aplicada/Libro%3A_Biometria_de_Recursos_Naturales_(Kiernan)/10%3A_Medidas_cuantitativas_de_diversidad%2C_similitud_de_sitios_e_idoneidad_del_h%C3%A1bitat/10.01%3A_Introducci%C3%B3n%2C_%C3%ADndice_de_Simpson_e_%C3%ADndice_Shannon-Weiner)
90. Interpretar todos los estadísticos y gráficas para Análisis de los componentes principales. [cited 30 Jun 2023]. Available: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/multivariate/how-to/principal-components/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/#principal-components-pc>
91. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011;12: 1–18.
92. Gasparrini AJ, Wang B, Sun X, Kennedy EA, Hernandez-Leyva A, Ndao IM, et al. Persistent metagenomic signatures of early-life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome. *Nature Microbiology*. 2019;4: 2285–2297.
93. Asada N. Tubular immaturity causes erythropoietin-deficiency anemia of prematurity in preterm neonates. *Sci Rep*. 2018;8: 1–9.
94. Stokholm, J., Blaser, M.J., Thorsen, J. et al. Maturation of the gut microbiome and risk of asthma in childhood. *Nat Commun* 9, 141 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02573-2>
95. Hosny, M., Bou Khalil, J.Y., Caputo, A. et al. Multidisciplinary evaluation of *Clostridium butyricum* clonality isolated from preterm neonates with necrotizing enterocolitis in South France between 2009 and 2017. *Sci Rep* 9, 2077 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38773-7>

96. Uzan-Yulzari A, Turta O, Belogolovski A, Ziv O, Kunz C, Perschbacher S, et al. Neonatal antibiotic exposure impairs child growth during the first six years of life by perturbing intestinal microbial colonization. *Nat Commun.* 2021;12: 1–12.
97. Chang H-Y, Chiang Chiau J-S, Ho Y-H, Chang J-H, Tsai K-N, Liu C-Y, et al. Impact of Early Empiric Antibiotic Regimens on the Gut Microbiota in Very Low Birth Weight Preterm Infants: An Observational Study. *Front Pediatr.* 2021;9: 651713.
98. Xu Y, Milburn O, Beiersdorfer T, Du L, Akinbi H, Haslam DB. Antibiotic exposure prevents acquisition of beneficial metabolic functions in the preterm infant gut microbiome. *Microbiome.* 2022;10: 1–15.
99. Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, Li H, et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med.* 2016;8: 343ra82.
100. Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, Ulaszewska M, Jeffery IB, O’Shea CA, et al. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome.* 2017;5: 1–18.
101. Arboleya S, Sánchez B, Solís G, Fernández N, Suárez M, Hernández-Barranco AM, et al. Impact of Prematurity and Perinatal Antibiotics on the Developing Intestinal Microbiota: A Functional Inference Study. *Int J Mol Sci.* 2016;17: 649.