

Patricia Bautista-Carbajal<sup>1</sup>, Pérez Gopar Martha Alicia<sup>2</sup>, Espinosa Torres Torija Bogart<sup>2</sup>, Hernández Pérez Brenda<sup>2</sup>, Rodríguez Bernabe Alma Angélica<sup>1</sup>, García León Miguel Leonardo<sup>1</sup>, Rivera Avalos Carlos Ernesto<sup>1</sup>, Santaella Servin Monserrat<sup>1</sup>, López Soto Iris Itzel<sup>1</sup>, Romero Rosalino Luz Alejandra<sup>1</sup>, Angel Ambrocio Antonio Humberto<sup>1</sup>, Wong Chew Rosa María<sup>1</sup>.

Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas, División de Investigación, Facultad de Medicina. UNAM<sup>1</sup>, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"<sup>2</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La microbiota es el conjunto de microorganismos que conviven en diferentes regiones anatómicas de individuos sanos en un nicho ecológico específico. Su composición es diversa y especializada, dependiendo de la región donde se ubica. Estos microorganismos coexisten en contacto directo con los humanos y mantienen una relación simbiótica. Un factor crítico que define la composición y distribución de las colonias está asociado a los requerimientos nutricionales, que obtienen del microambiente. El microbioma es el nombre que se le da a todos los genes dentro de estas células microbianas. Al nacer, el neonato tiene un sistema inmunológico inmaduro, que requiere los estímulos inmunogénicos del microbioma para madurar. El papel del microbioma humano en el proceso salud-enfermedad se ha redefinido en los últimos años y se ha reconocido su papel fisiológico. Las investigaciones sobre enfermedades infecciosas que se enfocaron durante mucho tiempo en el reconocimiento y el tratamiento de patógenos humanos individuales, reconocen cada vez más la necesidad de incorporar los hallazgos que surgen en el campo del microbioma en la práctica clínica diaria. La disbiosis en el microbioma intestinal se ha asociado con enfermedades. Se ha descrito que el modo de nacimiento cambia el microbioma intestinal, los recién nacidos son estériles y se colonizan después del nacimiento. Se sabe poco sobre el microbioma respiratorio en las primeras horas de vida.

## OBJETIVO

Comparar el microbioma intestinal y respiratorio en los recién nacidos obtenidos por cesárea y por parto eutócico en las primeras horas de vida.

## METODOLOGÍA

### Reclutamiento de pacientes:

Se invitó a las madres que parieron en las 24 horas previas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General de México a que sus hijos recién nacidos (RN) participaran en el estudio. Se tomaron lavados nasales y heces, se enviaron al Laboratorio de Investigación en Enfermedades infecciosas, de la Facultad de Medicina, UNAM.

### Extracción de ADN y secuenciación.

Se realizó la extracción de ADN de las muestras de heces y lavados nasales mediante un protocolo híbrido de trizol y el kit QIAamp Fast DNA Stool (Qiagen) ; se amplificó mediante PCR la región V3-V4 de la subunidad 16S de la RNA polimerasa de procariotas. Se realizó la secuenciación de 16S e identificación taxonómica de la microbiota en cada muestra de acuerdo a variaciones en la región amplificada V3-V4 de la subunidad 16S en muestras nasales e intestinales de acuerdo al tipo de nacimiento.

### Análisis de datos:

El análisis de las secuencias se llevó a cabo con QIIME2 y Tools for microbiome analysis in R. Se utilizó t de Student para variables cuantitativas y chi cuadrada para variables cualitativas.

## RESULTADOS

Madres		Fisiológico n=30	Cesárea n=30	p
<b>Comorbilidades</b>				
Preeclampsia, n (%)	0 (0)	4 (2.4)		
Hipotiroidismo, n (%)	0 (0)	1 (0.6)		
Diabetes gestacional, n (%)	1 (0.6)	5 (3)		
Tabaquismo y alcoholismo, n (%)	0 (0)	1 (0.6)		
Alcoholismo ocasional, n (%)	0 (0)	1 (0.6)		>0.9999
Obesidad, n (%)	3 (1.8)	1 (0.6)		
Hipotiroidismo subclínico, n (%)	1 (0.6)	2 (1.2)		
Molusco contagioso, n (%)	2 (1.2)	0 (0)		
Asma, n (%)	1 (0.6)	0 (0)		
No reportadas, n (%)	22 (13.2)	15 (9)		
<b>Ruptura de membranas</b>				
SI, n (%)	5 (3)	7 (4.2)		>0.9999
NO, n (%)	25 (15)	23 (13.8)		
<b>Infección de vías urinarias</b>				
SI, n (%)	14 (8.4)	15 (9)		>0.9999
NO, n (%)	16 (9.6)	15 (9)		
<b>Infección Cérvico-vaginal</b>				
SI, n (%)	14 (8.4)	14 (8.4)		>0.9999
NO, n (%)	16 (9.6)	16 (9.6)		
<b>Uso de antibiótico</b>				
SI, n (%)	5 (3)	10 (6)		>0.9999
NO, n (%)	25 (15)	20 (12)		
<b>IMC</b>				
Normal, n (%)	10 (6)	8 (4.8)		
Sobrepeso, n (%)	9 (5.4)	10 (6)		>0.9999
Obesidad, n (%)	11 (6.6)	12 (7.2)		

Recién nacidos		Fisiológico n=30	Cesárea n=30	p
Femenino, n (%)	12 (46)	16 (56)		0.34
Masculino, n (%)	14 (54)	13 (44)		
Peso, kg x±EE	3.11±0.39	3.03±0.33		0.57
Talla, cm x±EE	49±1.7	49±1.99		0.58
<b>Semanas de gestación</b>				
35	0	1		
36	0	1		
37	4	2		
38	5	4		
39	5	4		>0.9999
40	11	12		
41	3	4		
42	0	2		
43	1	0		
44	1	0		

Tabla 1 y 2. Características demográficas, clínicas y factores de riesgo de las madres y recién nacidos de acuerdo al tipo de nacimiento. No se observan diferencias significativas entre los grupos.

	Fisiológico n=30	Cesárea n=30	p
Microbioma detectado en heces, n (%)	30 (100)	30 (100)	
Microbioma detectado en lavados, n (%)	10 (33)	12 (40)	0.59

Tabla 3. Porcentaje de detección del microbioma en heces y lavados nasales por tipo de nacimiento. Se detectó 100% del microbioma en heces, pero solo 33% en parto fisiológico y 40% en cesárea en el microbioma nasal de los recién nacidos.

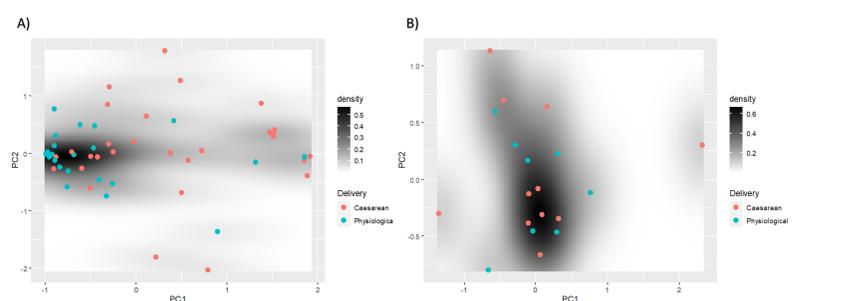


Figura 1. Beta diversidad (Escala multidimensional no métrica). (A) Se observa un agrupamiento del microbioma intestinal de los recién nacidos por parto fisiológico (p=0.01). (B) No se observan patrones específicos en las muestras de lavados nasales de acuerdo al tipo de nacimiento.

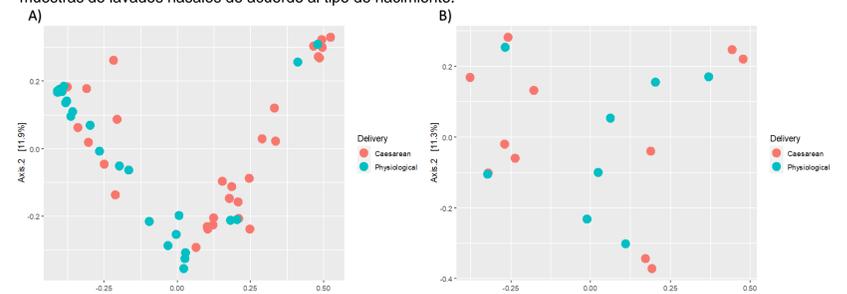


Figura 2. Beta diversidad (componentes principales). (A) Se observan dos patrones en las poblaciones del microbioma intestinal de los recién nacidos de acuerdo con el tipo de nacimiento. (B) No se observan patrones específicos en el microbioma nasal de recién nacidos de acuerdo al tipo de nacimiento.

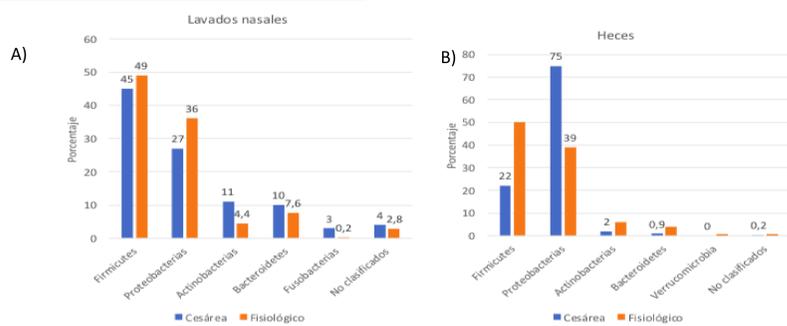


Figura 3. Abundancia relativa a nivel de Phylum. (A) En el microbioma nasal se observó una mayor cantidad de Proteobacterias y Firmicutes en los nacidos por cesárea. (B) En el microbioma intestinal se observó una mayor abundancia de Firmicutes en los nacimientos fisiológicos y mayor abundancia de Proteobacterias en los nacidos por cesárea.

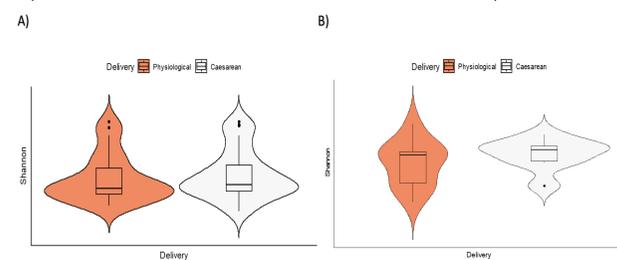


Figura 4. No se encontraron diferencias en la Alfa diversidad en el microbioma intestinal (A) y nasal (B) de los recién nacidos de acuerdo con el tipo de nacimiento.

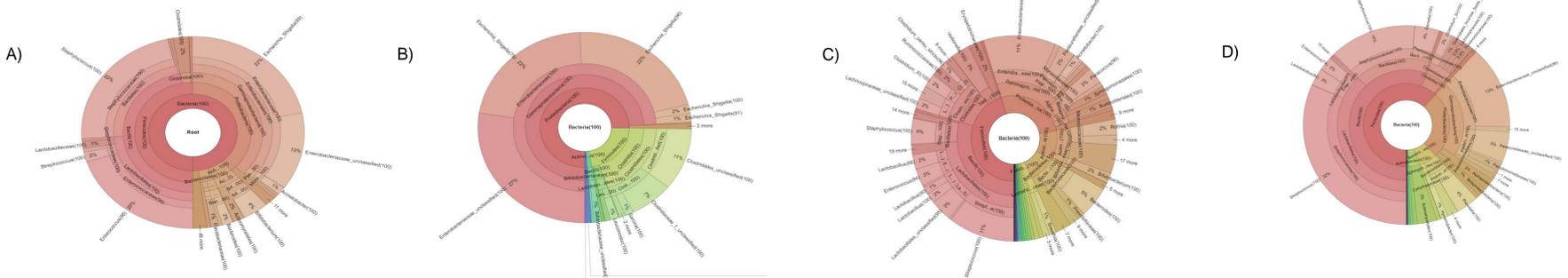


Figura 5. Análisis taxonómico. (A) A nivel de género en el microbioma intestinal de RN obtenidos por cesárea se detectó *Enterococcus* en 20%, *Streptococcus* 2%, *Lactobacillae* 1%, *Staphylococcus* 22%, *Clostridiales* 2%, *Escherichia-Shigella* 22%, *Enterobacteriaceae* 13%, *Acinetobacter* 1%, *Bifidobacterium* 4%, *Actinomycetales* 2%, *Bacteroides* 2%, *Flavobacteriaceae* 1%; (B) en el microbioma intestinal de recién nacidos por parto fisiológico *Enterobacteriaceae* 27%, *Escherichia Shigella* 47%, *Clostridiales* 18%, *Sarcina* 1%, *Leuconostoc* 1%, *Bifidobacterias* 1%. Hubo una mayor diversidad de género en muestras respiratorias de RN obtenidos por parto fisiológico (C) comparado con recién nacidos por cesárea, quienes tuvieron mayor proporción de *Staphylococcus* y *Streptococcus* que están asociadas a la piel (D).

## CONCLUSIONES

- En 67% de los recién nacidos por parto fisiológico y 60% de nacidos por cesárea no se detecta microbioma nasal en las primeras horas del nacimiento en contraste con el 100% de detección del microbioma intestinal independientemente del modo de nacimiento.
- En el microbioma nasal no se encontraron diferencias importantes a nivel del Phylum, pero el análisis de género mostró una mayor diversidad en el RN por parto fisiológico, además de una mayor proporción de *Streptococcus* y *Staphylococcus* en RN nacidos por cesárea.
- Existen diferencias en la composición bacteriana en el microbioma intestinal de acuerdo al modo de nacimiento en las primeras horas de vida.
- Se observa una mayor cantidad de Proteobacterias en el parto fisiológico y una mayor proporción de Firmicutes en recién nacidos por cesárea.
- Los bebés nacidos por cesárea presentan en el microbioma intestinal bacterias asociadas a la piel como *Staphylococcus* y *Streptococcus* que no se observan en bebés nacidos por parto vaginal en el que predominan las *Enterobacteriaceae*, *Escherichia* y *Shigella* que son bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal materno.

## REFERENCIAS

- 1 Aho, V. T. E. et al. The microbiome of the human lower airways: a next generation sequencing perspective. *World Allergy Organ J* 8, (2015).
- 2 Harper, A. et al. Viral Infections, the Microbiome, and Probiotics. *Front Cell Infect Microbiol* 10, 596166 (2020).
- 3 Rintala, A. et al. Gut Microbiota Analysis Results Are Highly Dependent on the 16S rRNA Gene Target Region, Whereas the Impact of DNA Extraction Is Minor. *J Biomol Tech* 28, 19–30 (2017).
- 4 Leo Lahti, Sudarshan Shetty et al. (2017). Tools for microbiome analysis in R. Version . URL: <http://microbiome.github.com/microbiome>.
- 5 Bolyen E, et al.. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852–857