



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Caracterización de la diversidad de la
microbiota de la leche materna de mujeres
mexicanas”**

TESIS

Que presenta

QFB. Karina Corona Cervantes

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS
En la especialidad de:
Genética y Biología Molecular.

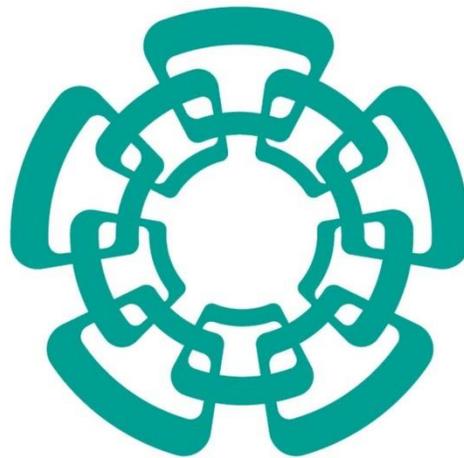
Director de Tesis

Dr. Jaime García Mena

Ciudad de México

Agosto del 2018.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Referencia y Apoyo para la Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco bajo la dirección del Dr. Jaime García Mena, con la colaboración del Hospital General de Ecatepec “Dr. José María Rodríguez” bajo supervisión del Dr. Martín Noé Rangel Calvillo, jefe del Servicio del Banco de Leche Humana.



Cinvestav

Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia en la secuenciación por ION Torrent, al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con el material del laboratorio y a Viridiana Rosas Ocegueda, por su asistencia administrativa y secretarial.

Este trabajo fue financiado por Cinvestav; CONACyT 163235 INFR-2011-01 y FONSEC SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT-233361.

Los autores de este trabajo estamos profundamente agradecidos con todas las mujeres y los recién nacidos participantes en el estudio.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada durante el transcurso de la maestría (CVU: 777953).

A los integrantes de mi Comité Tutorial:

- ✓ Dr. Jaime García Mena por aceptarme en el laboratorio y brindarme su apoyo, tutoría y enseñanza durante todo el desarrollo del proyecto.
- ✓ Dr. Bulmaro Cisneros Vega por su apoyo como parte del comité tutorial.
- ✓ Dr. Efraín Garrido Guerrero por sus consejos y aportaciones importantes a mi trabajo

Al Dr. Martín Noé Rangel Calvillo por la supervisión médica para la selección de las donantes y su apoyo en la recolección tratamiento de las nuestras; al Químico Francisco Guillermo Borquez Arreorta por su apoyo en el procesamiento de muestras en el Banco de Leche Humana y a la Lic. en E. Alma Yadira Lemus Hernández, por su asistencia administrativa.

A la Dra. en C. Igrid García González por su invaluable apoyo durante el desarrollo de este proyecto, desde el muestreo, la etapa de experimentación, estandarización de procesos hasta la revisión del texto de la tesis.

Al M. en C. Fernando Hernández Quiroz por su apoyo en los análisis de datos de las muestras.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Baruch HaShem Toda! Gracias HaShem por estar conmigo cada uno de mis días, en los mejores y en los peores, ni todas las palabras existentes bastarían para agradecerte.

A Papá y Mamá, parte de este logro es suyo. Siempre han estado ahí para mí no importa cuán descabellados sean mis planes, gracias por amarme mucho, por llamarme y orar por mí, gracias por todo el esfuerzo que han hecho por mí, por invertir en mi educación y criarme de la mejor manera que pudieron. ¡Los quiero!. A Mis hermanos, gracias por apoyarme en diferentes maneras, por estar pendiente de mí en toda esta etapa y siempre ser tan atentos conmigo.

A mis compañeros de laboratorio: Fernandito, Aida, Fernandote, Ale, Loan y Khem, gracias a todos ustedes por ayudarme cuando lo necesitaba, por tomar té conmigo y hacerme reír haciendo tan divertido el laboratorio.

Al laboratorio de farmacología. ¡Flor! Mil gracias por todo, gracias por escucharme, por enseñarme foto, por mimarnos, por cuidarme cuando me enfermaba, por hacer amena nuestra estancia y por apoyarnos en tantas maneras. Dr. Carlos Hoyo, gracias por permitirnos estar en su laboratorio, por prestarnos ese espacio. Vianey, gracias por ayudarme con mis muestras.

A Bren... Gracias por ser la mejor compañera y amiga, gracias por ser tan buena conmigo, hacer que todos los experimentos y las tardes en el laboratorio fueran mejor. Disfruté mucho esta etapa y estoy feliz de haberla compartido contigo.

Estef y Andrea. No imagino la maestría sin ustedes, gracias por hacer tan divertido la etapa de clases y animarme cuando quería enloquecer, gracias por aventarse todas las temporadas de novela de mi estancia en CDMX.

Picantería: (Diego, Adrian, Caro). Gracias por esas comidas y salidas tan divertidas.

Alice y Nacho. ¡Gracias a los 2 por quererme, aunque vivieron conmigo! Jaja gracias por aguantarme en mis peores días, animarme cuando quería morir y alimentarme. Nacho, gracias por acompañarme desde que llegué, por escucharme, darme ideas, motivarme, por vivir conmigo toda esta aventura y hacer que todo fuera mejor y divertido. ¡Gracias!

Torres y Beth: Mil gracias por ser mis amigos, por compartir tantas cosas buenas: pláticas, viajes y siempre estar ahí cuando lo necesité. Los quiero mucho.

Por último, gracias a la secretaria Gaby por su excelente trabajo y apoyo administrativo en los trámites de cada cosa.

ÍNDICE

Tabla de contenido

Tabla de contenido	6
ÍNDICE DE TABLAS	i
ABREVIATURAS	iv
1.1 Leche materna y sus beneficios.....	1
1.2 Translocación de la microbiota.....	3
1.3 Bancos de leche	4
II. ANTECEDENTES	6
III. JUSTIFICACIÓN	9
ALCANCE	9
IV. HIPÓTESIS	10
V. OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	12
6.1 Diseño y tipo de estudio	12
6.2 Muestras	12
6.3 Extracción y purificación de DNA genómico.....	13
6.4 Amplificación de la región V3 del rDNA 16S.....	14
6.5 Construcción de genoteca y secuenciación ION TORRENT.	16
6.6 Análisis de datos de secuenciación.....	16
6.7 Análisis estadístico de la microbiota.....	18
VII. RESULTADOS	19
7.1 Características de la población estudiada.	19
7.2 Construcción de Genotecas para secuenciación por Ion Torrent	22
7.3 Composición de la microbiota de la leche y el copro de neonatos con base a la abundancia relativa.	23
7.4 Diversidad alfa de la microbiota de la leche fisiológica, pasteurizada y el copro de bebé y comparación entre grupos.....	26
7.5 Diversidad beta de la microbiota de la leche fisiológica, pasteurizada y el copro de bebé y comparación entre grupos.....	28

7.6 Diferencias taxonómicas en la microbiota de la leche fisiológica, pasteurizada y el copro de bebé con base al análisis de discriminación lineal LEfSe (Linear discriminant analysis effect size)	30
7.7 Análisis de la asociación de la diversidad de la microbiota con las rutas metabólicas en muestras de leche fisiológica y copro de lactantes por PICRUST.....	31
VIII. DISCUSIÓN.....	33
IX. CONCLUSIONES	40
X. PERSPECTIVAS	40
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	41
XII. ANEXOS	1
Anexo A.....	1
Anexo B.....	2
Anexo C.....	3
Anexo D.....	10
Anexo E	14

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microbiota de la leche humana: Características de estudios reportados ...	7
Tabla 2. Primers y mezcla de reacción para la amplificación de la región V3.	15
Tabla 3. Condiciones para la amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA con BARCODE.....	15
Tabla 4 Datos de muestras colectadas en el estudio.....	19
Tabla 5. Características sociodemográficas y clínicas de las madres. Los datos se muestran como medias y desviaciones estándar o como porcentajes.....	20
Tabla 6. Características sociodemográficas de los neonatos estudiados.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 . Anatomía de la mama. Tomado de Blázquez, M, 2017.....	1
Figura 2 Vía enteromamaria bacteriana..	4
Figura 3 . Regiones polimórficas de del gen 16S RNA amplificada (García-Mena et al., 2016)	14
Figura 4 .Descripción general del análisis bioinformático para el perfil microbiano del gen rRNA 16S.	17
Figura 5. A) Gel de agarosa al 1.5% teñido con Midori Green para productos de PCR de la región V3 del gen 16S ribosomal con barcodes. (281 pb). B) Gel de agarosa al 0.5% teñido con Midori Green Para DNA genómico de muestras de leche materna y copro	22
Figura 6 . Comparación de la abundancia relativa de la microbiota entre los grupos estudiados.	23
Figura 7 .Abundancia Relativa de géneros más abundantes de muestras de Leche Fisiológica provenientes del Hospital Dr. José María Rodríguez	24
Figura 8 .Abundancia Relativa de géneros más abundantes de muestras de Leche Pasteurizada provenientes del Hospital Dr. José María Rodríguez.	25
Figura 9 . Abundancia Relativa de géneros más abundantes en muestras de copro de bebé provenientes del Hospital Dr. José María Rodríguez.	25
Figura 10 . Distribución de muestras de leche fisiológica y pasteurizada según índices de diversidad alfa.	26
Figura 11 . Distribución de muestras para leche fisiológica y copro de bebé de acuerdo a los índices de diversidad alfa.	27
Figura 12 .Análisis de componentes principales (PCoA*) de la diversidad de la microbiota presente en la leche fisiológica y pasteurizada (ANOSIM**: P=0.051) ..	28
Figura 13 . Análisis de coordenadas principales (PCoA*) de la diversidad de la microbiota presente en la leche fisiológica y el copro de bebé (ANOSIM**: P=0.001).....	29

Figura 14. Comparación LEfSe (Linear discriminant analysis effect size) entre taxones bacterianos significativos ($p < 0.05$) para leche fisiológica y pasteurizada (LDA=2).....	30
Figura 15. Diferenciación entre taxones bacterianos con valores de p y q significativos (< 0.05) para leche fisiológica y copro de bebé (LDA=4) identificados mediante análisis de discriminación lineal (LEfSe).....	31
Figura 16. Variación funcional de las vías metabólicas en muestras de leche fisiológica y copro de bebé, singficativas para p y q (< 0.05).	32

ABREVIATURAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IMC	Índice de Masa Corporal
LM	Leche Materna
OMS	Organización Mundial de Salud
OTU	Unidad Taxonómica Operacional
QIIME	Conocimientos Cuantitativos en la Ecología Microbiana.
RNA	Ácido Ribonucleico
UFC	Unidad Formadora de Colonias

RESUMEN

La leche materna es el alimento más completo, tanto desde el punto de vista nutritivo, inmunológico y microbiológico. Debido a su variabilidad inter e intra poblacional diversos estudios han dirigido su atención hacia la composición taxonómica de la microbiota de la leche humana en distintas poblaciones. En México, no existen datos sobre la diversidad de la microbiota de la leche humana. El objetivo de este trabajo fue caracterizar y comparar la población microbiana presente en la leche materna (fisiológica y pasteurizada) de mujeres mexicanas, así como microbiota del colon de neonatos mediante secuenciación masiva, para lo cual se colectaron muestras pareadas de leche humana de mexicanas sanas y copro de lactantes procedentes del Hospital Dr. José María Rodríguez, Estado de México. De cada muestra se extrajo el DNA y se prepararon genotecas de lacto DNA mediante la amplificación de la región V3 del RNA 16S por PCR punto final, para proceder a la secuenciación semiconductor de iones (Ion Torrent). Se encontró que la leche de mujeres mexicanas es rica en bacterias pertenecientes al Phylum Proteobacteria y Firmicutes, y los géneros *Staphylococcus*, *Phyllobacteriaceae* y *Streptococcus*. Estas bacterias predominan incluso después del proceso de pasteurización, aunque dicho proceso modificó la dominancia de algunas especies bacterianas. De la misma manera se encontraron géneros que se compartieron entre las muestras de leche humana y el copro de los lactantes apoyando la hipótesis de la transferencia bacteriana de la leche al intestino del neonato. Estos resultados constituyen la primera aproximación sobre la composición de la microbiota presente en la leche de mujeres mexicanas.

ABSTRACT

Breast milk is the most complete food, from a nutritional, immunological and microbiological point of view. Due to its inter and intra poblational variability several studies have turned their attention towards to the taxonomical composition of the microbiota in the human milk in different populations. There is no data in Mexico about the diversity of the human milk microbiota, for this reason the aim of this study was to characterize the bacterial population in mexican breast milk (raw and pasteurized) and compare it with the infant gut microbiota; for this purpose, paired samples of breast milk and infant faecal samples were collected from the Dr. José Maria Rodriguez Hospital in Estado de Mexico. From each sample DNA was extracted and DNA libraries was prepared for the amplicyng of the V3 region of the ribosomal RNA (rRNA) gene by endpoint PCR, after that, sequencing was performed with Ion semiconductor sequencing (Ion Torrent).

As results we observed that the mexican breast milk microbiota were composed of a higher proportion of Proteobacteria and Firmicutes and the genera *Staphylococcus*, *Phyllobacteriaceae* and *Streptococcus* even after the pasteurization process, which modified the dominance of some bacterial species. In the same way, genera was shared between infant faeces and human milk samples, that support the hypothesis of the vertical transfer of bacteria via breastfeeding towards the infant intestine. These results constitute the first approximation on the composition of the microbiota present in the milk of Mexican women.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Leche materna y sus beneficios

La leche humana es un fluido biológico complejo y específico para la especie, se considera como una fuente primaria de nutrición para los recién nacidos, ya que proporciona todos los nutrientes protectores y funcionales requeridos por el bebé de rápido crecimiento durante los primeros 6 meses de vida (American Academy of Pediatrics, 2012; Fernández *et al.*, 2013). La leche humana es producida en grupos de células denominados alvéolos, y de ahí se transporta a través de conductos galactóforos hacia los senos galactóforos, que actúan como depósito de reserva como se observa en la figura 1 (Stephen *et al.*, 1989).

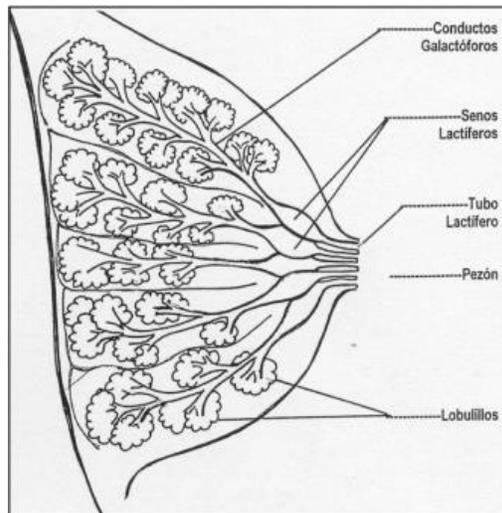


Figura 1 . Anatomía de la mama. Tomado de Blázquez, M, 2017

Entre los componentes que la leche proporciona al lactante se encuentran: carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas, minerales, galacto-oligosacáridos que tienen una función prebiótica, inmunoglobulinas (IgA) citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, hormonas y otras inmunoglobulinas que junto con otras sustancias protegen al recién nacido frente a infecciones y contribuye a estrechar el vínculo madre-hijo, favoreciendo un adecuado desarrollo psicomotor (Fernández *et al.*, 2013; Morrow *et al.*, 2004).

Además de promover el desarrollo del sistema inmune, la leche humana confiere cierto grado de protección al lactante contra patógenos y diferentes enfermedades como: infección respiratoria baja, enterocolitis necrotizante, infección urinaria, meningitis, síndrome de muerte súbita, etc. y en edad adulta evita padecer de otras enfermedades como diabetes tipo 1 y 2, dermatitis atópica, asma, obesidad, leucemia, linfoma, enfermedad celíaca, hipertensión arterial y arterioesclerosis (Fitzstevens *et al.*, 2016; Osorio & Umbarila, 2015; Van Gysel *et al.*, 2012); Así mismo protege a la madre contra el cáncer de endometrio (Rosenblatt & Thomas, 1995), y el cáncer de ovario (Danforth *et al.*, 2007).

Uno de los componentes más importantes de la leche humana son los probióticos mutualistas que modulan la activación del sistema inmunológico, previenen el crecimiento de bacterias patógenas y pueden sintetizar vitaminas (Newburg D. S., 2005).

1.1 Microbiota de la leche materna

Recientemente, varios estudios han revelado que el calostro y la leche materna son fuentes continuas de bacterias comensales, mutualistas y potencialmente probióticas en el intestino del lactante, (Fernández *et al.*, 2013)

La detección de bacterias vivas y DNA bacteriano de la leche ha desafiado el dogma predominante de que la leche humana es normalmente estéril y proporcionó la evidencia convincente de que la leche humana contiene su propia microbiota única, comunidades bacterianas han sido identificadas en la leche humana por análisis dependientes de cultivo como independientes de cultivo (Fig3) (Hunt *et al.*, 2011; Vaidya *et al.*, 2016).

La microbiota de la leche materna ayuda a desarrollar y establecer el sistema inmunológico y digestivo del lactante, de la misma forma fomenta el desarrollo de la propia microbiota intestinal del neonato ya que es proporcionada continuamente durante todo el periodo de lactancia (Martín *et al.*, 2003; Clemente *et al.*, 2012).

Muchos estudios han demostrado que la leche materna contiene varios tipos de bacterias como *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. y

Bifidobacterium spp., que se transfieren de madre a hijo (Fernández *et al.*, 2013). De esta forma se consideraba que la leche materna adquiría bacterias cuando salía de la glándula mamaria, sin embargo, la presencia de bacterias como *Bifidobacterium* spp., indica un origen diferente (Sakata *et al.*, 2005).

Asimismo, en estudios realizados en mujeres sanas, la diversidad de la microbiota caracterizada en la leche humana fue: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., y *Enterococcus* spp. (Osorio & Umbarila, 2015 ; Martin *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2008).

Estos microorganismos pueden contribuir a la digestión infantil a través de la descomposición de azúcares y proteínas, desarrollan un notable potencial para desempeñar papeles metabólicos en el lactante y reduce la incidencia y la gravedad de la respuesta alérgica (Fernández *et al.*, 2013).

I.2 Translocación de la microbiota

La vía entero-mamaria sugiere que los microbios ubicados en el intestino materno se trasladan a las glándulas mamarias y, al consumir leche, colonizan el intestino del lactante (Rescigno *et al.*, 2001; Jost *et al.*, 2015).

Se ha descrito la existencia de un mecanismo de translocación bacteriana endógeno entero-mamario, donde bacterias no patógenas son capturadas por células dendríticas (DC) que pueden penetrar en el epitelio intestinal o macrófagos en el intestino materno abriendo las uniones estrechas entre las células epiteliales intestinales para acceder a los ganglios linfáticos mesentéricos de las placas de Peyer y circular dentro del sistema linfático asociado a mucosas, tal proceso de ilustra en la figura 2 (Osorio & Umbarila, 2015; Martin *et al.*, 2004; Gómez-Gallego *et al.*, 2016). Además, se sabe que, durante el período de lactancia, la colonización de la glándula mamaria por las células del sistema inmune es un proceso selectivo por las hormonas lactogénicas (Fernández *et al.*, 2013).

La microbiota de la leche humana contiene algunos de los primeros microorganismos que se introducirán el intestino del lactante, lo que podría jugar un

papel importante en la colonización de su intestino y en el desarrollo del sistema inmunológico. (Fitzstevens *et al.*, 2016)

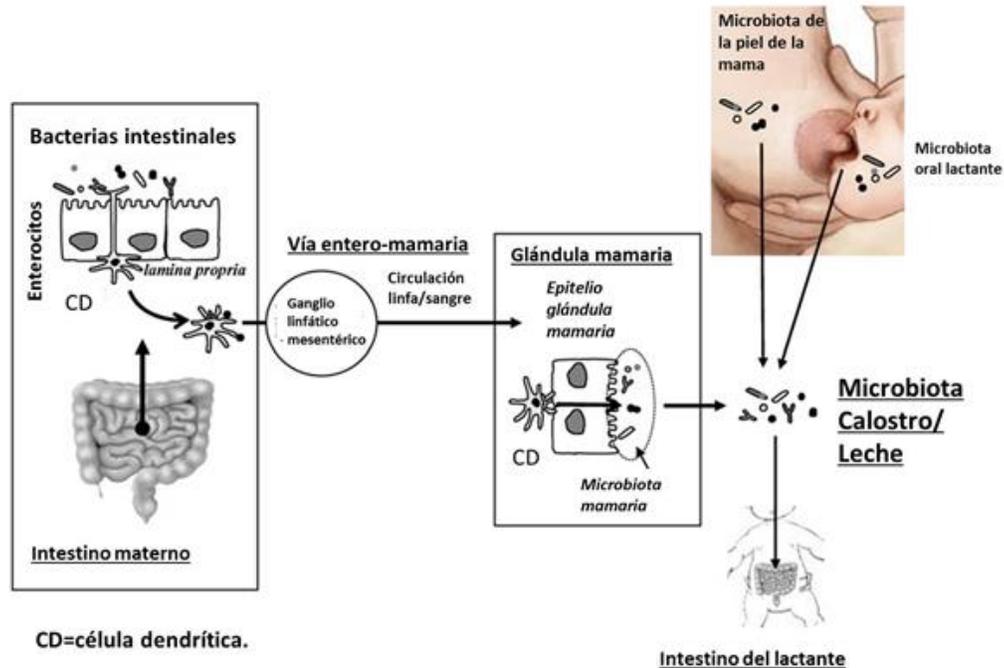


Figura 2 Vía enteromamaria bacteriana. Fuentes potenciales de las bacterias presentes en el calostro humano y la leche. Tomado y modificado de Fernandez *et al.*, *Pharmacological Research* 69 (2013).

I.3 Bancos de leche

Debido a que la leche materna puede transmitir bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*), virus (VIH, Zika), drogas, e incluso la madre puede no producir la suficiente leche; se crearon los bancos de leche humana, que proveen leche materna a quienes la necesitan.

Estos bancos son centros especializados, vinculados a una unidad de salud hospitalaria con atención obstétrica y neonatológica, responsable de la promoción y apoyo a la lactancia materna, que efectúa actividades de recolección, almacenamiento, procesamiento, control de calidad de los productos lácteos como

calostro, leche de transición y leche madura, para su distribución con calidad a los recién nacidos hospitalizados. (De León Luna, 2012; Gobierno del Estado de México, 2017).

En estos bancos se tiene garantía de calidad para evitar la entrega de leche contaminada; además, se realizan estudios microbiológicos, de macronutrientes y se le aplica el tratamiento térmico de pasteurización, el cual consiste en elevar la temperatura a 62.5° durante 30 minutos con la finalidad de disminuir la carga bacteriana y así evitar posibles infecciones en los neonatos que la consumen; por último se almacenan a -20° C hasta su uso (Arslanoglu *et al.*, 2010, Hartmann, *et al.*, 2007; Lam *et al.*, 2012).

Sin embargo, a la luz del conocimiento actual sobre la presencia natural de bacterias mutualistas o probióticas debe ser considerarse por los bancos de leche si la leche fresca se mantiene como el criterio estándar para la nutrición infantil o se pasteuriza, teniendo en cuenta que dicho proceso pudiera tener efectos no deseables sobre algunos componentes de la leche (Marín *et al.*, 2009; de Segura *et al.*, 2012; Björkstén *et al.*, 1980).

Por tal motivo, el potencial probiótico de las bacterias presentes en la leche materna debería ser un motivo de reflexión para los bancos de leche, el desconocimiento de la existencia de una microbiota específica en la leche materna ha propiciado que entidades desechen aquellas leches que contienen un recuento total de entre 10^3 y 10^5 ufc/ml, a pesar de que dichas concentraciones se encuentran de forma natural en la leche de prácticamente cualquier mujer sana (Rodríguez *et al.*, 2008).

Aunque en México existen iniciativas tanto internacionales como nacionales para el uso de lactarios y bancos de leche implementadas por la OMS en 2001 y por la Ley General de Salud artículo 64 fracción II), estudio como este pueden fomentar y promover la implementación de nuevas estrategias, para el bienestar de los infantes mexicanos.

II. ANTECEDENTES

Actualmente se han descrito múltiples trabajos que aumentado nuestra comprensión de la composición de la microbiota de la leche, donde se reporta la descripción de la microbiota en leche materna en diferentes condiciones y empleando diferentes técnicas, considerando que la diversidad de las especies microbianas puede estar influenciada por factores específicos, tales como: la genética, la salud materna y la nutrición, el modo de parto, la etapa de lactancia , peso corporal y la ubicación geográfica (Gómez-Gallego *et al*, 2016).

Diferentes reportes de estudios en microbiota de leche humana realizados en distintos países se resumen en la Tabla 1.

Todo esto nos indica que la microbiota y el microbioma de la leche humana varían en cada población, motivo por el cual su estudio en la leche materna de población mexicanas es objeto de este trabajo.

Tabla 1. Microbiota de la leche humana: Características de estudios reportados

Referencia Localización	Pregunta de investigación	Población de estudio	Análisis	Resultados: Biodiversidad bacteriana	Conclusión
Urbaniak et al., 2016 Canadá	Examinar la microbiota de la LM en relación a la forma de nacimiento. (Vaginal, cesárea)	Mujeres Sanas Canadienses	Illumina 16S rDNA	<i>Proteobacteria</i> y <i>Firmicutes</i> y en el <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> . nivel de género,	Reveló los diversos tipos de bacterias transferidos a los recién nacidos bacteriana independientemente de cuándo y cómo nace el bebé
Cabrera-Rubio et al., 2012 Finlandia	Identificar factores pre y posnatales que puedan influir en las comunidades bacterianas que habitan la leche humana.	Mujeres finlandesas sanas Con variaciones en IMC	qPCR. Región V1- V2 del 16S rDNA	Mujeres con IMC grande, presentaron un alto número de <i>Lactobacillus</i> , número similar de <i>Staphylococcus</i> , y una menor proporción of <i>Bifidobacterium</i> en comparación con las de bajo IMC.	El microbioma de la leche humana cambia durante la lactancia y está relacionada con el IMC.
Vaidya, et al., 2016 India	Análisis comparativo de la microbiota de leche materna en mujeres que viven en la ciudad y comunidad rural Caracterización microbiota de mujeres hindús	Mujeres Sanas de comunidades rurales y urbanas en India	Ion Torrent (PGM) región V2-V3 del 16S rDNA	Taxones difieren altamente en abundantes, incluyendo <i>Proteobacteria</i> (P = 0,008) y <i>Firmicutes</i> (P = 0,046), y diversidad microbiana general Mayor proporción de <i>Proteobacteria</i> y menor número de <i>Firmicutes</i>	El estilo de vida diferente puede alterar rápidamente la microbiota de la leche.
Hunt et al., 2011, Estados Unidos	Evaluar la estabilidad y la diversidad de la LM de madres respecto al tiempo.	Mujeres Sanas Estados Unidos	Pirosecuenciación región V1- V2 del 16S rDNA	9 géneros centrales OTU presentes en todas las muestras: <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Bradyrhizobium</i>	LM contiene una comunidad bacteriana diversa y compleja. <i>Corynebacteria</i> spp. y <i>Propionibacteria</i> provienen de piel de las mamas.

				<i>Predominant: Staphylococcus, Streptococcus, y Propionibacterium.</i>	
Collado et al., 2009 España	Caracterizar la microbiota de la LM.	Mujeres Sanas españolas	qRT-PCR (primers genero específico)	Predominante <i>Bifidobacterium, Lactobacillus, Staphylococcus</i>	LM contiene una abundancia de ADN bacteriano.
Ward et al., 2015 Canadá	Examinar el metagenoma de LM	Mujeres sanas Ottawa, Canadá	Illumina 16S rDNA	Predominante: <i>Pseudomonas, Staphylococcus, y Streptococcus</i>	La diversidad bacteriana puede ser beneficiosa; Los beneficios no están asociados con géneros o especies particulares.
Jost et al., 2013 Suiza	Investigar diversidad microbiana de LM de madres que dan a luz	Mujeres sanas provenientes de Zurich, Suiza	Pirosecuenciación y Secuenciación Sanger 16S rDNA	Predominante: <i>Staphylococcus, Streptococcus, and Propionibacterium</i> No detectaron: Proteobacteria y Bacteroidetes	LM puede influir significativamente en la colonización intestinal del lactante y sistema immune (secuencias inmunomoduladoras)
Sakwinska et al., 2016 China	Investigar diversidad microbiana de LM de mujeres chinas en diferentes etapas de lactancia.	Mujeres Chinas sanas	qPCR 16S rDNA Illumina	<i>Staphylococcus</i> spp. y <i>Streptococcus</i> spp., fueron predominantes	No encontraron ningún efecto en la etapa de lactancia sobre la composición de la microbiota, aunque conclusión se limita a los primeros 2 meses de lactancia.

Nota.-

III. JUSTIFICACIÓN

La leche materna ha demostrado ser una excelente y continua fuente de bacterias comensales y potencialmente probióticas para el intestino del lactante.

Entre los factores que pueden influenciar en la composición de la microbiota de la leche humana, está la ubicación geográfica, por lo que es de investigar su impacto en el microbioma de la leche materna en poblaciones mexicanas aportaría información relevante ya que no hay reportes de ello.

Aunque nuevas técnicas han aumentado nuestra comprensión de la composición de la microbiota de la leche, existen pocos datos sobre la bioactividad de la leche materna pasteurizada y no se ha evaluado como la pasteurización afecta el microbioma de la leche ni su efecto en las poblaciones microbianas del intestino de los lactantes.

Con este estudio se pretende contribuir a generar un mayor conocimiento sobre la microbiota de la leche humana de mujeres mexicanas sanas, y hacer valer los beneficios de la ingestión de leche humana en la colonización microbiana del intestino infantil.

ALCANCE

Para caracterizar la microbiota de la leche humana y del colon de neonatos, se coleccionarán muestras de leche de mujeres mexicanas antes y después de pasteurizar y muestras fecales de sus recién nacidos, procedentes del Hospital General “Dr. José María Rodríguez”, en Ecatepec de Morelos, Estado de México. Con los análisis de secuenciación masiva de iones se determinará la composición y el grado de variabilidad de las comunidades microbianas presentes en los diferentes tipos de muestras analizadas, y se evidenciará si existe preponderancia o disminución de grupos bacterianos y/o género de microorganismos.

IV. HIPÓTESIS

Existe una microbiota particular en la leche materna de las mujeres mexicanas cuya composición se modifica de manera significativa luego del proceso de pasteurización. Esta lactomicrobiota ejerce influencia sobre la microbiota del colon distal de los lactantes.

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la comunidad bacteriana presente en la microbiota de la leche de mujeres mexicanas y evaluar los cambios en su diversidad después del proceso de pasteurización y su influencia sobre la microbiota presente en el colon distal de neonatos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo Específico 1. Caracterizar y comparar la diversidad de la comunidad bacteriana en muestras pareadas de leche humana fisiológica y pasteurizada con base al 16S rDNA.

Actividades del objetivo:

Recolectar muestras de leche materna pareadas (fisiológica y pasteurizada) de recién paridas clínicamente sanas.

Extraer DNA total y crear genotecas con base a la secuencia 16S rDNA.

Secuenciar de forma masiva mediante la tecnología semiconductora de iones (Ion Torrent).

Objetivo Específico 2. Caracterizar y comparar la diversidad de la microbiota de pares de leche fisiológica-copro de neonatos alimentados con lactancia materna exclusiva.

Actividades del objetivo:

Colectar muestras de copro de neonatos

Extraer DNA total de copro de neonatos y crear las genotecas en base a la secuencia 16S rDNA.

Secuenciar de forma masiva mediante la tecnología semiconductora de iones (Ion Torrent).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño y tipo de estudio

Estudio descriptivo observacional de tipo transversal.

Criterios de inclusión

Se consideraron a todas las mujeres de origen mexicano, aparentemente sanas y en periodo de lactancia entre los días cero y 8 después del parto, y que aceptaron participar voluntariamente en el estudio.

Criterios de Exclusión

- Consumo de alcohol, cigarrillos o algún tipo de drogas durante el embarazo.
- Diabetes mellitus tipo 1 y 2.
- Obesidad
- Mujeres bajo tratamiento hormonal de algún tipo o bajo tratamiento con antibióticos durante más de la mitad del embarazo.

6.2 Muestras

El tamaño de muestra se determinó mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia, tomando en cuenta a las pacientes recién paridas que fueron reclutadas en el periodo de noviembre de 2017 a enero de 2018 y mujeres que entregaron muestras en el banco de leche del Hospital General “Dr. José María Rodríguez”, en Ecatepec de Morelos, Estado de México.

Colección de muestras

Se reclutaron 42 mujeres mexicanas en período de lactancia aparentemente sanas y sus bebés sanos, sin sufrimiento fetal (amamantados exclusivamente con leche materna entre 0-8 días) los cuales fueron reclutados del Hospital General en Ecatepec de Morelos “Dr. José María Rodríguez”. Las características clínicas de los pares madre-hijo se muestran en las Tablas 5 y 6.

Se colectaron muestras de leche humana sin pasteurizar y pasteurizada en tubos estériles de polipropileno de 50 mL mediante extracción manual bomba.

Se recolectó un volumen aproximado de 2 mL de leche materna requiriéndose 2 tubos por sujeto de estudio, uno se empleó para la leche en condiciones fisiológicas normales y el otro para someterse al proceso de pasteurización; posteriormente ambas muestras se transvasaron a tubos de 1.5 mL y se almacenaron a -20°C.

Paralelamente se colectaron muestras de copro de quienes reciben la leche de sus respectivas madres; dichas muestras se recogieron en contenedores estériles y se almacenaron a 4 ° C hasta su entrega al laboratorio.

Cada participante respondió un cuestionario general que incluyó datos sociodemográficos y clínicos de la madre y su recién nacido.

6.3 Extracción y purificación de DNA genómico.

Todas las muestras de leche se sometieron a un pretratamiento para eliminar el contenido de grasa. Se tomó 1mL de leche previamente homogenizada y se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos. Se extrajo la capa de grasa depositada en la parte superior del tubo y se eliminó el sobrenadante. El pellet celular se lavó con 1 mL de PBS estéril. A continuación, se procedió a la extracción del ADN utilizando el kit Favorprep Stool DNA isolation Minikit (Favorgen©). Para las muestras con un volumen inferior a 1mL se utilizó el kit de extracción FavorPrep Milk Bacterial DNA Extraction Kit (Favorgen©). Para las muestras de heces se empleó el kit de extracción "QIAamp DNA Stool Mini Kit©". En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

La concentración de DNA total purificado se determinó mediante el cociente de absorbancia 260/280 utilizando el equipo NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific); de igual forma se llevó a cabo el fraccionamiento electroforético de DNA total para verificar su integridad en gel de agarosa al 0.5 % teñido con 0.80 µL de colorante Midori Green advanced (1:15), utilizando regulador de corrida TBE (Tris-Borato-EDTA), mezclando 1 µL de regulador de carga (azul de bromofenol, glicerol 2X), con 5 µL de DNA, aplicando 90 Volts durante 50 min.

La visualización de las bandas de interés se realizó con el sistema de documentación “Molecular Imager® Gel Doc™ XR de BioRad”.

6.4 Amplificación de la región V3 del rDNA 16S.

Una vez obtenido del DNA este fue usado para preparar genotecas que posteriormente se usaron para secuenciación masiva; se hizo uso de cebadores universales que están dirigidos para la amplificación de la región polimórfica V3 del gen de rDNA 16S (Fig. 3).

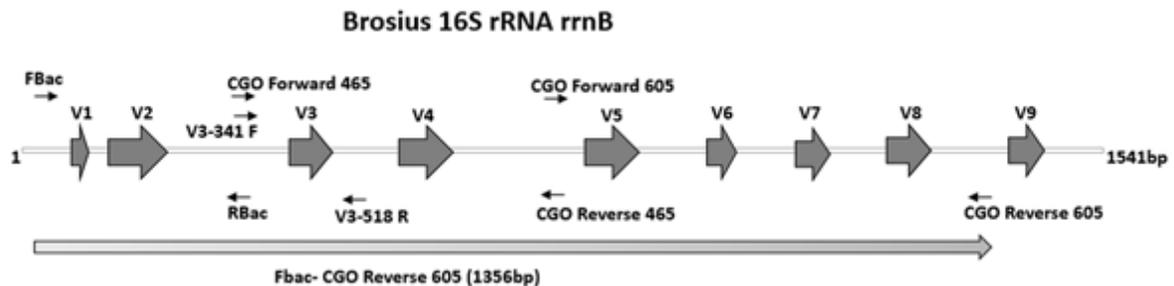


Figura 3. Regiones polimórficas de del gen 16S RNA amplificada (García-Mena et al., 2016)

Estos primers contienen una secuencia de nucleótidos única denominada “barcode” la cual permite marcar e identificar cada muestra durante el proceso de secuenciación, así mismo contiene secuencias adaptadoras útiles en la tecnología de secuenciación masiva semiconductor de iones.

La amplificación se realizó mediante PCR punto final utilizando los primers y condiciones descritas en la tabla 2 y 3, trabajando con un volumen final de 50 µL por reacción.

Se llevó a cabo el análisis de la calidad de los amplicones generados en cada muestra por fraccionamiento electroforético analítico en geles de agarosa al 2.0% utilizando la metodología descrita previamente; el tamaño esperado de estos fragmentos fue de 281 pb.

Tabla 2. Primers y mezcla de reacción para la amplificación de la región V3.**Primers:****V3 341F: 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG -3' (Secuencias asignadas BARCODE)****V3 518R: 5'- ATTACCGCGGCTGCTGG- 3**Tamaño del producto: **281 pb**DNA por Reacción: **50 ng**Volumen por reacción: **50 µL**

Reactivo	[Stock]	Concentración Final	Volumen / muestra
Buffer	10x	1x	5 µL
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	4 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1 µL
V3 341F	10 µM	0.2 µM	1 µL
V3-518R	10 µM	0.2 µM	1 µL
Taq Pol	5 U/µl	0.025 U/µl	0.25 µL

Tabla 3. Condiciones para la amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA con BARCODE

	Temperatura	Tiempo (minutos)	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	10 :00	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	0:15	25 ciclos
Alineamiento	62°C	0:15	
Extensión	72°C	0:15	
Extensión final	72°C	10:10	1 ciclo
	10°C	10:00	

6.5 Construcción de genoteca y secuenciación ION TORRENT.

Después de preparar la genoteca de amplicones para las muestras de leche materna y de copro, se llevó a cabo el análisis de calidad, así como el acondicionamiento de las genotecas de las muestras para su secuenciamiento en el equipo Ion Torrent (Rothberg *et al.*,2011) de acuerdo con la siguiente descripción:

Preparación de genotecas: Se mezclaron las muestras con barcodes específicos, se purificaron y cuantificó la concentración final de DNA en la genoteca

Análisis de calidad del DNA se verificó el tamaño de los amplicones de la genoteca utilizando el equipo Bioanalyzer

Preparación del templado: Se acondicionaron esferas y se llevó a cabo reacciones de PCR masivas, así mismo se verificó la calidad de las esferas con la muestra a secuenciar utilizando equipos ION One Touch™ system y flourometro Qubit 2.0

Secuenciación masiva: Se realizó la limpieza del equipo, preparación de soluciones a utilizar, secuenciación de muestras, obtención de señales por flujo y por ciclo en equipo ION Torrent PGM™ Sequencer.

Análisis de datos: Las señales se convirtieron en lectura de bases, se analizó la calidad del proceso, las lecturas obtenidas y la generación de archivos de cada muestra de acuerdo con la lista de barcodes empleados, se obtuvieron los archivos en formato FASTQ para su posterior análisis.

6.6 Análisis de datos de secuenciación

Las lecturas obtenidas por el equipo se procesaron utilizando el “software Torrent Suite v4.4.3” Se asignaron las lecturas a la muestra de origen por medio de los “barcodes”.

Las lecturas que pasaron las pruebas de calidad fueron exportadas como archivos FASTQ que posteriormente fueron transformados a archivos FASTA, y fueron analizados con el software QIIME pipeline versión 1.9.0. (<http://qiime.org/>)

Las secuencias se agruparán en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) utilizando el algoritmo UCLUST la asignación taxonómica (Fig4) se llevó a cabo por el alineamiento de las secuencias contra la base de datos 16S rDNA GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov/>) (McDonald *et al.*, 2012).

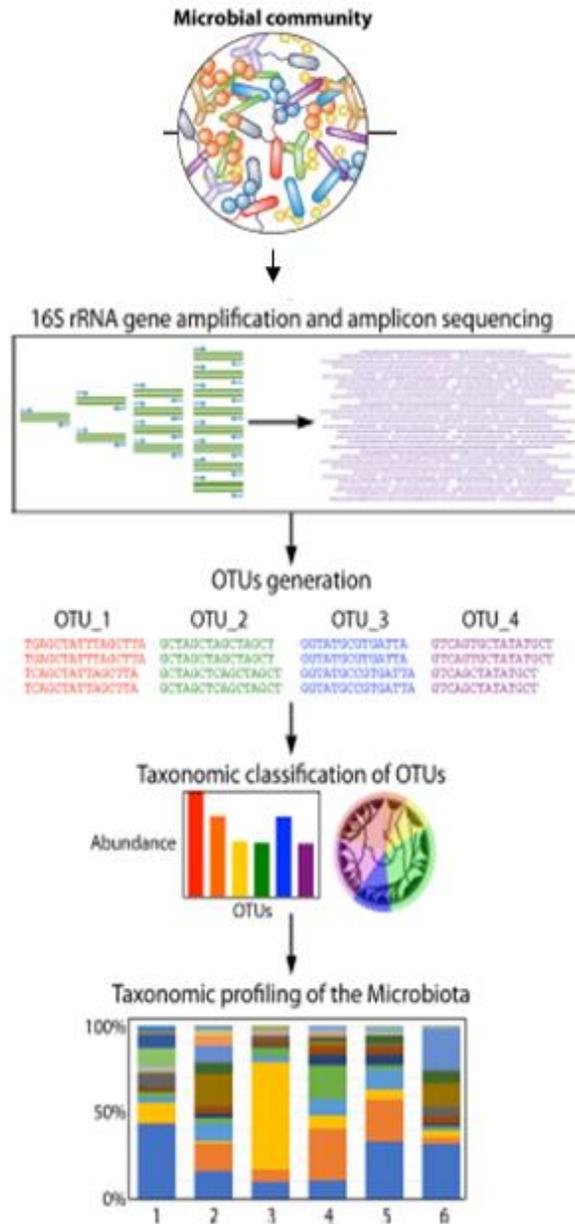


Figura 4. Descripción general del análisis bioinformático para el perfil microbiano del gen rRNA 16S. Desde la extracción de ADN de una comunidad microbiana y la secuenciación posterior, hasta la generación de perfiles taxonómicos de la microbiota.

6.7 Análisis estadístico de la microbiota.

El análisis de datos se hará por t-Student o por U Mann-Withney. Los valores de $p < 0.05$ se consideran significativos. Las operaciones estadísticas se harán utilizando el programa SPSS (versión 14.0).

La diversidad microbiana se calculó usando diversidad alfa (dentro muestras) y diversidad beta (entre muestras). Diversidad alfa se estimó usando diferentes matrices: OTUs observados, índice de Chao, índice de Shannon e índice de Simpson (Vaidya *et al.*, 2017).

Los análisis de diversidad beta se llevaron a cabo utilizando UniFrac generando diagramas de coordinados principales y la abundancia relativa de los grupos bacterianos identificados en las muestras se compararon por la prueba de rangos de Wilcoxon mediante el software el programa SPSS (versión 14.0)

El algoritmo LDA Side Effect (LEfSe) fue usado para identificar taxones estadísticamente significativos in los diferentes grupos de muestras (Segata *et al.*, 2011)

Se usó PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States), para predecir metagenomas funcionales basados en datos del gen rRNA 16S utilizando base de datos de genomas de referencia (Vaidya *et al.*, 2017).

VII. RESULTADOS

7.1 Características de la población estudiada.

Como resultado del muestreo realizado en el hospital general “Dr. José María Rodríguez” de noviembre del 2017 a enero del 2018, se obtuvieron 98 muestras, éstas muestras consistieron en: leche materna fisiológica, leche materna pasteurizada y copro de neonatos. Los detalles de las muestras se observan en la tabla 4.

Tabla 4 Datos de muestras colectadas en el estudio.

Muestras Totales	98
<i>Leche Materna</i>	84
Pasteurizada	42
Fisiológica	42
<i>Copro de Bebé</i>	14

Las características de la población estudiada se dividieron en datos clínicos y datos sociodemográficos se muestran en la tabla 5, en los cuales se observa que el 45.2 % de las participantes fueron originarias de Estado de México el 35.7% de Ciudad de México y el resto de las participantes representando una fracción más pequeña provenían otros estados de la república como Veracruz, Hidalgo, Oaxaca, Guerrero.

La principal ocupación de esta población es ama de casa (88.11%) y el 52.09% tienen educación básica.

Los datos clínicos indican que las mujeres participantes en promedio fueron normopeso (23.2 ± 6.5), el 81% de las mujeres tuvieron parto vaginal y el 19% tuvieron cesárea.

Los datos recolectados para los lactantes (tabla 6) indican que la mayoría son neonatos saludables y sin sufrimiento fetal; el 96.4% se encontraba en un normopeso y la distribución de sexo fue: 62% masculino y 33% femenino.

Tabla 5. Características sociodemográficas y clínicas de las madres. Los datos se muestran como medias y desviaciones estándar o como porcentajes.

Datos de las madres (n=42)	
Procedencia	
Estado de México	45.2
CDMX	35.7
Oaxaca	7.1
Veracruz	7.1
Puebla	4.8
Ocupación (n, %)	
• Ama de casa	88.1
• Estudiante	4.8
• Trabajadora	7.1
Nivel de escolaridad (n, %)	
• Primaria	31.0
• Secundaria	19.0
• Preparatoria	38.1
• Universitario	7.1
• Ninguno	4.8
Edad materna (años ± desviación estándar)	23.07 ± 6.59
Edad gestacional en semanas (n, %)	
• < 37	2.4
• 37-40	88.1
• > 40	9.5

Paridad (n,%)	
• Nulípara	78.6
• Multípara	21.4
Modo de parto (n, %)	
• Vaginal (n, %)	81
• Cesárea (n, %)	19

Tabla 6. Características sociodemográficas de los neonatos estudiados.

Datos de los neonatos (n=20)	
Sexo	
• Femenino (n, %)	28 (66.7)
• Masculino (n, %)	14 (33.3)
Talla al nacer (cm)	49.57 ± 16.4
Peso (g)	
<2500	4.8
2500-4500	92.9

7.2 Construcción de Genotecas para secuenciación por Ion Torrent

A partir de las muestras de leche materna y copro de los participantes se extrajo DNA total y se corrió en un gel de agarosa al 0.5 % para observar la integridad del DNA (Figura 5a)

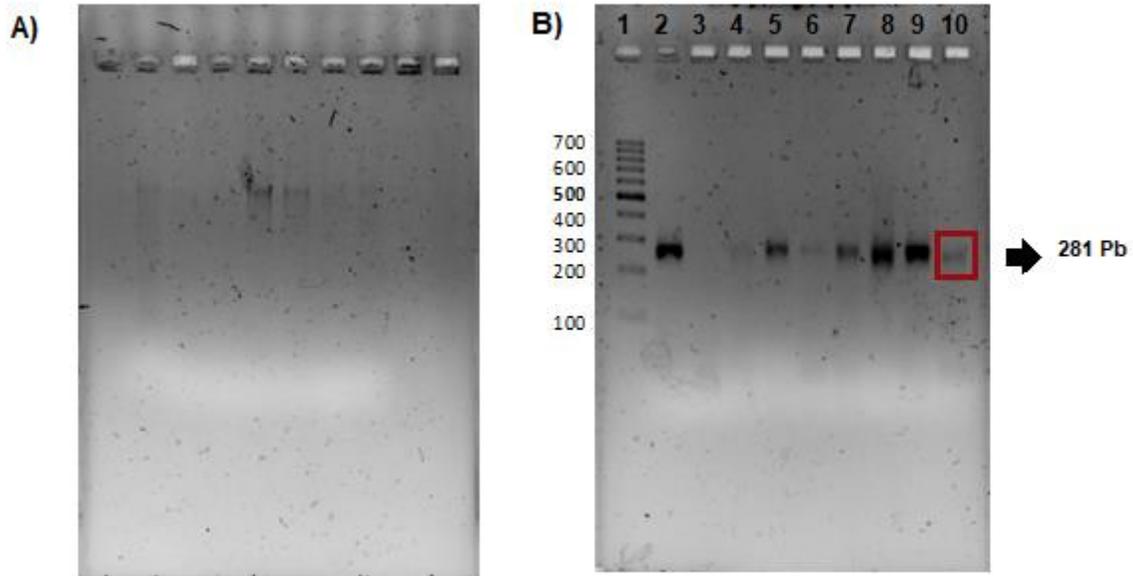


Figura 5. A) Gel de agarosa al 1.5% teñido con Midori Green para productos de PCR de la región V3 del gen 16S ribosomal con barcodes. (281 pb). **B)** Gel de agarosa al 0.5% teñido con Midori Green Para DNA genómico de muestras de leche materna y copro

Posteriormente se amplificó la región V3 del gen 16S ribosomal usando los primers barcode V3 341F específicos por muestra (Anexos, tabla de barcodes) y V3 518 R para tener un producto de PCR de 281 pb (Figura 5b) con la finalidad de obtener una genoteca de DNA para ser secuenciada por secuenciación semiconductiva de iones (ION Torrent).

7.3 Composición de la microbiota de la leche y el copro de neonatos con base a la abundancia relativa.

A partir de los datos generados por la secuenciación masiva se determinó la abundancia relativa de la microbiota a nivel de phylum, familia y género en los tres grupos de muestras: leche fisiológica, pasteurizada y copro de neonatos (Fig 6).

Entre las muestras de leche (fisiológica y pasteurizada) no se encontraron diferencias significativas al nivel taxonómico de phyla ($p=0.68$). *Proteobacteria* (46% vs 52%) y *Firmicutes* (40% vs 32%) fueron los más abundantes, mientras que *Bacteroidetes* (7% en ambos grupos) y *Actinobacteria* (7% vs 9%) se encontraron en menor proporción. Por su parte, en el copro de los lactantes se encontró un predominio de *Proteobacteria* (38%), *Firmicutes* (29%) y *Actinobacteria* (20%) y una menor frecuencia de *Bacteroidetes* (13%), siendo estas proporciones significativamente diferentes a las observadas en la leche fisiológica ($p=0.014$)

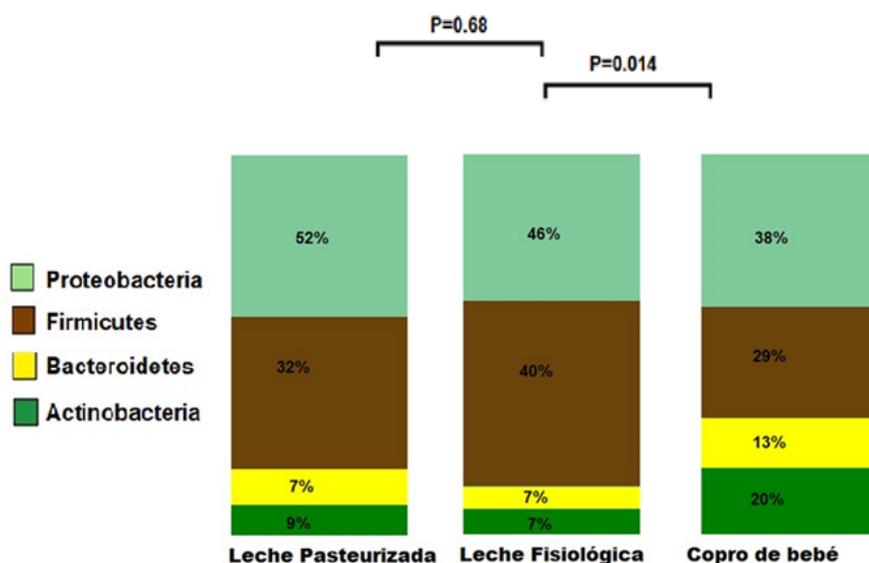


Figura 6. Comparación de la abundancia relativa de la microbiota entre los grupos estudiados. Valor de P para comparación de proporciones entre dos grupos

En cuanto a la descripción por género, 13 géneros bacterianos fueron los más predominantes en leche materna fisiológica: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Kaistobacter*, *Erwinia*, *Phyllobacteriaceae* NC (no clasificado), *Xanthomonadaceae* NC y *Enterobacteriaceae* NC pertenecientes al Phylum proteobacteria; de phylum

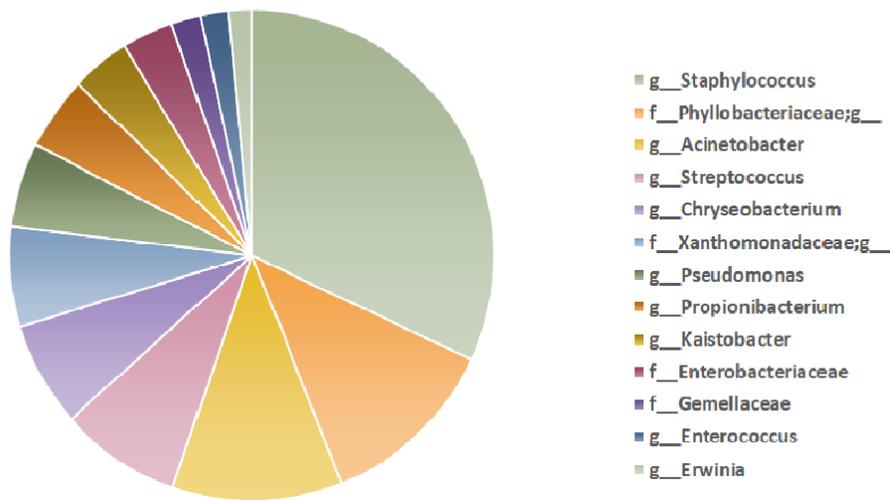


Figura 7. Abundancia Relativa de géneros más abundantes de muestras de Leche Fisiológica provenientes del Hospital Dr. José María Rodríguez

Firmicutes: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Chryseobacterium*, *Gemellaceae* *Enterococcus* y *Propionibacterium*. (Actinobacteria); estos géneros bacterianos conformaron el 83% de la abundancia relativa total (Fig7).

En leche pasteurizada los grupos bacterianos: *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Chryseobacterium*, *Acinetobacter*, *Paracoccus*, *Enterococcus*, *Gemellaceae*; y bacterias de la familia *Phyllobacteriaceae*, *Xanthomonadaceae* y *Bifidobacteriaceae* conformaron el 82% de las bacterias totales en este tipo de leche (Fig 8).

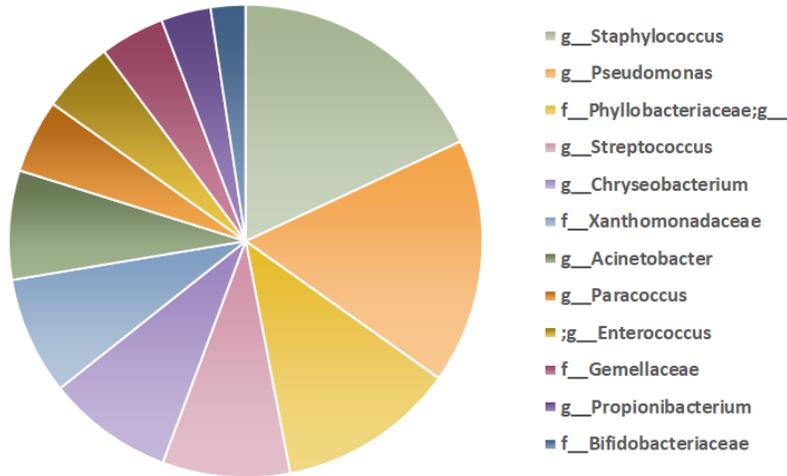


Figura 8. Abundancia Relativa de géneros más abundantes de muestras de Leche Pasteurizada provenientes del Hospital Dr. José María Rodríguez.

En muestras de copro de bebé, bacterias pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae* (26.3%), y los géneros *Bifidobacterium* (16%), *Bacteroides* (11.3%), *Enterococcus* (5%), *propionibacterium* (4.9%), *Prevotella* (3.1%) y *Veillonella* (2%) ocuparon los 7 lugares de mayor abundancia formando el 70% de la abundancia relativa total (Fig 9).

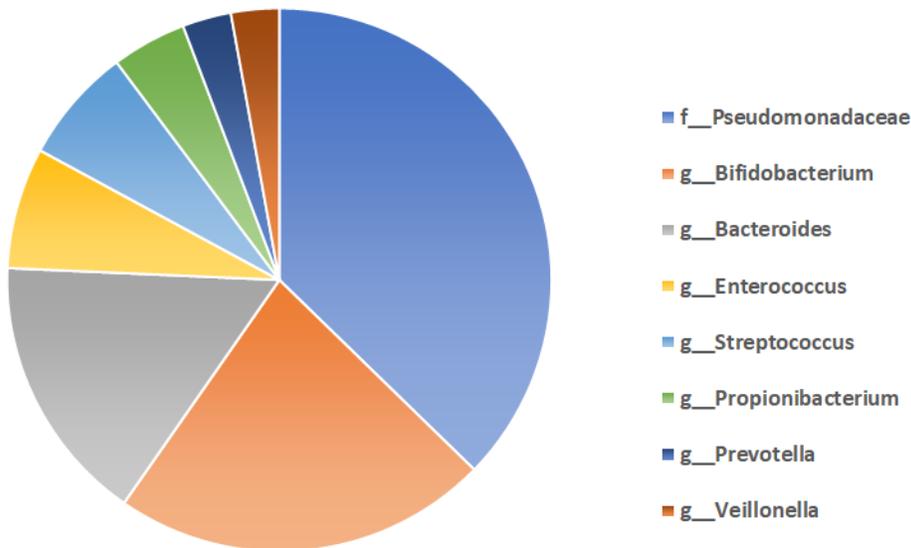


Figura 9. Abundancia Relativa de géneros más abundantes en muestras de copro de bebé provenientes del Hospital Dr. José María Rodríguez.

7.4 Diversidad alfa de la microbiota de la leche fisiológica, pasteurizada y el copro de bebé y comparación entre grupos.

Los análisis de diversidad alfa se usaron para cuantificar el número de especies bacterianas y su distribución dentro de cada muestra. a través del cálculo del número de OTUS observados y los índices de diversidad específica de Chao1, Shannon y Simpson. Con ellos se compararon las comunidades bacterianas presentes en los grupos de leche (pasteurizada y fisiológica) y entre la leche fisiológica y el copro de bebé. En nuestro análisis, el índice de diversidad de Simpson reveló mayor dominancia bacteriana en la leche pasteurizada con respecto a la fisiológica (86% vs 81%, $P=0.03$ para el test no paramétrico de rangos de Wilcoxon), lo cual indica que, probablemente, el efecto de la temperatura disminuye la diversidad de especies microbianas lo que implica una mayor dominancia de ciertas bacterias en la leche pasteurizada en comparación con la leche cruda En lo que respecta a los índices de Shannon y Chao1 no se obtuvieron diferencias significativas (fig.10).

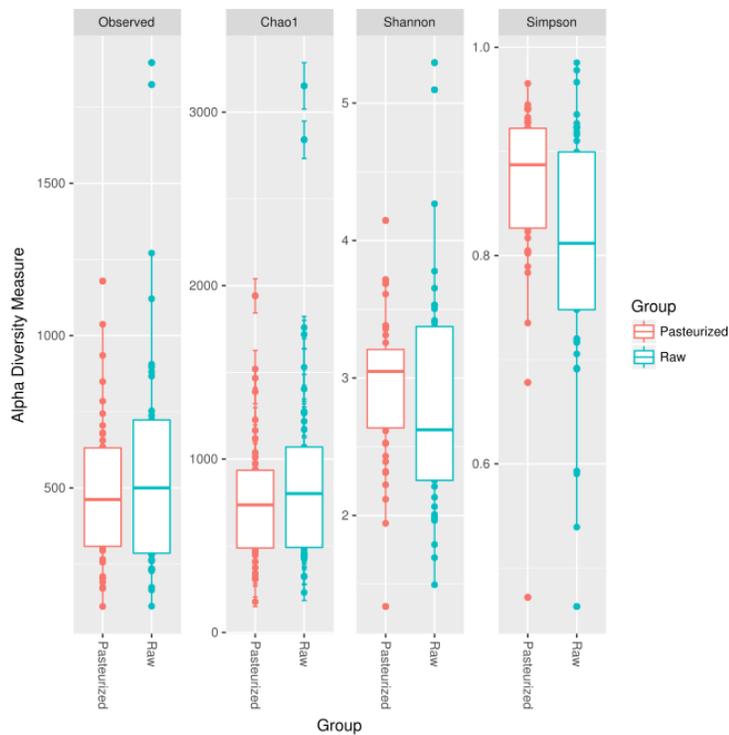


Figura 10. Distribución de muestras de leche fisiológica y pasteurizada según índices de diversidad alfa.

Al comparar con el copro de bebé, se encontró un aumento significativo de la diversidad bacteriana observada en la leche fisiológica (500.5 vs 333.3, $P=0.023$ para el test no paramétrico de rangos de Wilcoxon) (Fig 11). Asimismo, el estimador Chao1 indicó una mayor riqueza microbiana en la leche fisiológica con respecto a la que contiene la microbiota intestinal neonatal (53.5 vs 45.9, $P=0.048$ para el test no paramétrico de rangos de Wilcoxon).

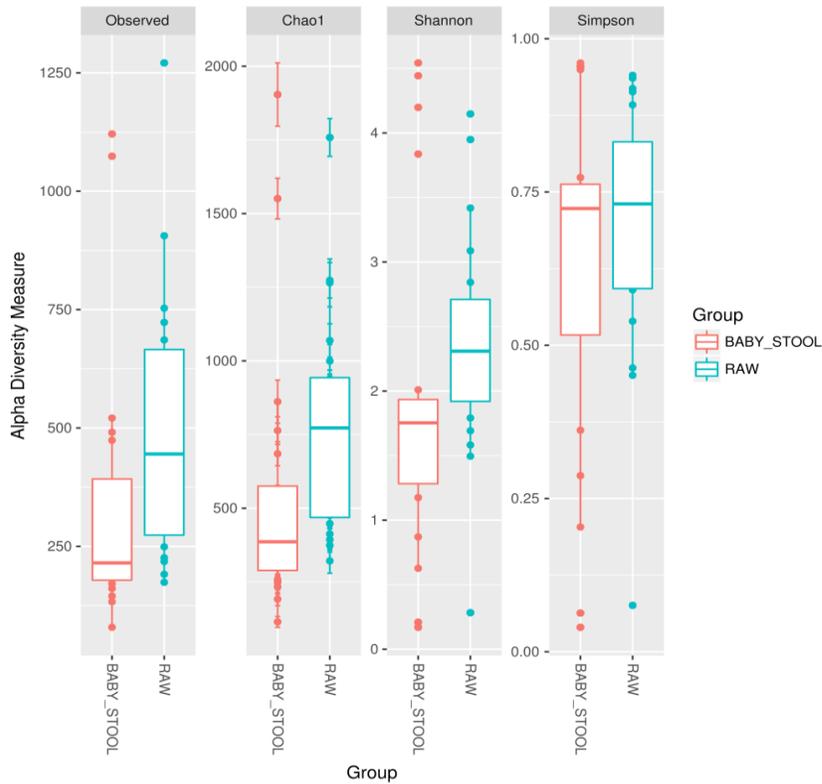


Figura 11. Distribución de muestras para leche fisiológica y copro de bebé de acuerdo a los índices de diversidad alfa.

7.5 Diversidad beta de la microbiota de la leche fisiológica, pasteurizada y el copro de bebé y comparación entre grupos.

La diversidad beta se utilizó para cuantificar y comparar el grado de diferenciación, también referido como distancia o similitud (análisis UniFrac) entre cada par de muestras. Para ello se calculó la distancia Weighted Unifrac entre las muestras pareadas para realizar el análisis de coordenadas principales (PCoA). Con base a este análisis (PCoA) se demostró que ambos grupos de leche son similares (ANOSIM: $P=0.051$), lo cual era de esperarse porque se trata de muestras pareadas que provienen de la misma donante (Fig 12).

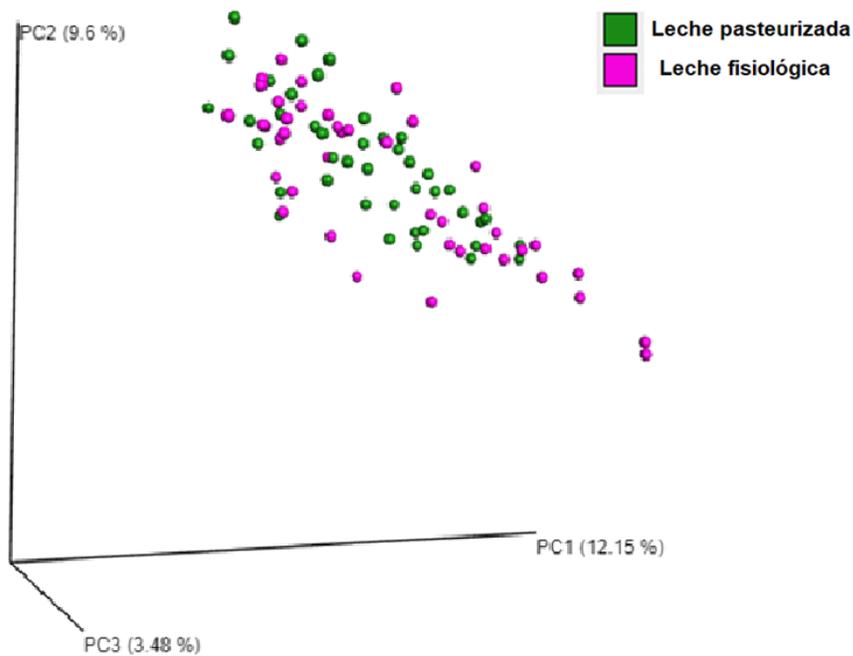


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCoA*) de la diversidad de la microbiota presente en la leche fisiológica y pasteurizada (ANOSIM**: $P=0.051$)

Por el contrario, el análisis de coordenadas principales (PCoA) indicó una clara diferenciación entre las muestras de leche fisiológica y el copro de bebé. De acuerdo a este comportamiento, se puede considerar a estos grupos como dos poblaciones microbianas separadas e independientes, lo cual fue demostrado

estadísticamente mediante un análisis multivariado de similitud (ANOSIM: $R^2=0.218$; $P=0.001$) que fue validado (Adonis: $R^2=0.886$, $P=0.01$).

Ambos estadísticos toman en cuenta la abundancia relativa de OTUs en contraposición a la presencia/ausencia de OTUs obtenidos en el análisis Unifrac (Fig 13).

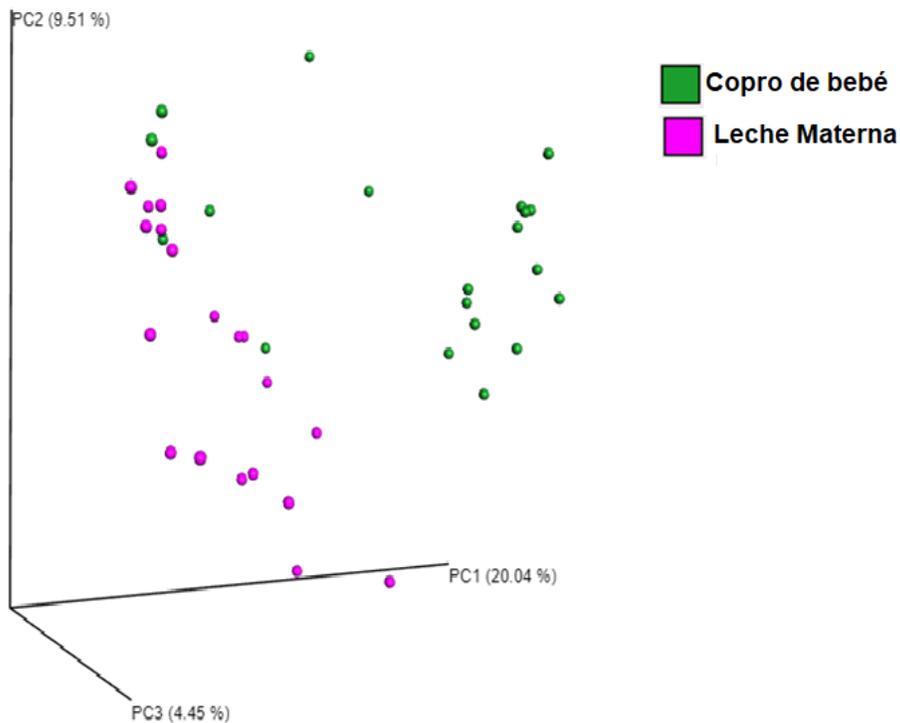


Figura 13. Análisis de coordenadas principales (PCoA*) de la diversidad de la microbiota presente en la leche fisiológica y el copro de bebé (ANOSIM**: $P=0.001$)

Se evaluó se si había diferencias en la diversidad considerando los días de toma de muestra, el modo de parto y el origen geográfico de las donantes. En ningún caso hubo significancia, estadística esto podría deberse a el tamaño de muestras analizadas, probablemente al aumentar el número de muestras se alcance la significancia estadística.

7.6 Diferencias taxonómicas en la microbiota de la leche fisiológica, pasteurizada y el copro de bebé con base al análisis de discriminación lineal LEfSe (Linear discriminant analysis effect size).

Se utilizó el algoritmo LEfSe para identificar las diferencias taxonómicas significativas en la microbiota de los grupos de muestras estudiados. Para ello LEfSe utiliza la prueba de suma de rango de Kruskal-Wallis para detectar características significativas asociadas con diferentes clases, la prueba de rangos de Wilcoxon y un análisis de discriminación lineal (LDA) para estimar el tamaño del efecto.

En este trabajo se utilizó un punto de corte o umbral de significación para LDA de 2.0. para el análisis entre los tipos de leche, encontrándose que 17 grupos bacterianos, (9 en leche fisiológica y 8 en pasteurizada) fueron significativamente diferentes entre tipos de leche (Fig 14).

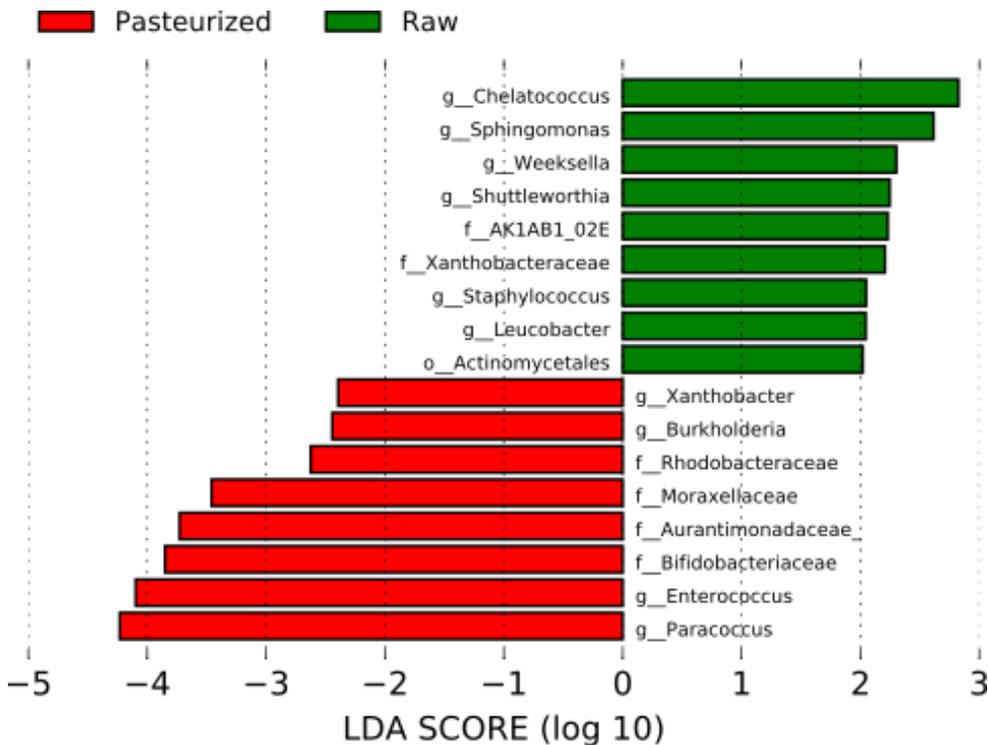


Figura 14. Comparación LEfSe (Linear discriminant analysis effect size) entre taxones bacterianos significativos ($p < 0.05$) para leche fisiológica y pasteurizada (LDA=2).

Para el análisis de leche fisiológica- copro de bebé se utilizó un punto de corte de significación para LDA de 3.0. Obteniendo como resultado que 17 grupos taxonómicos fueron significativos, 15 para el grupo de leche materna y 2 para copro de bebé (Fig 15).

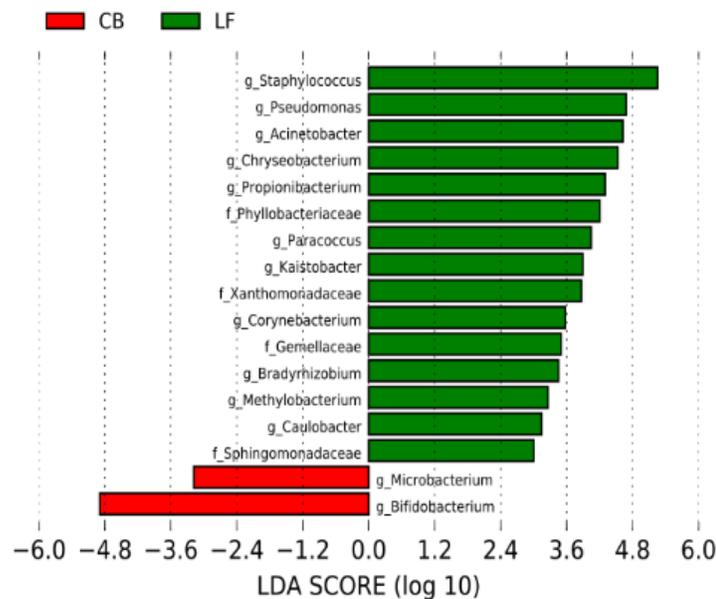


Figura 15. Diferenciación entre taxones bacterianos con valores de p y q significativos (<0.05) para leche fisiológica y copro de bebé (LDA=4) identificados mediante análisis de discriminación lineal (LEfSe).

7.7 Análisis de la asociación de la diversidad de la microbiota con las rutas metabólicas en muestras de leche fisiológica y copro de lactantes por PICRUST

Finalmente, se realizó un análisis de la asociación de la diversidad de la microbiota con rutas metabólicas, para ello se utilizó una herramienta estadística que emplea los datos de abundancia relativa contra la base de datos de Greengenes y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (PICRUST), para analizar cuales rutas metabólicas pueden estar implicadas por las abundancias relativas de las bacterias presentes en las muestras y de esta manera examinar si existen disparidades en la composición bacteriana entre la leche materna y el copro de bebé.

El análisis de PICRUST identificó once vías metabólicas funcionales y mostró que, a pesar de la variación inter e intraindividual (diversidad alfa y beta) en la composición de la microbiota intestinal de los neonatos y de la leche fisiológica, las

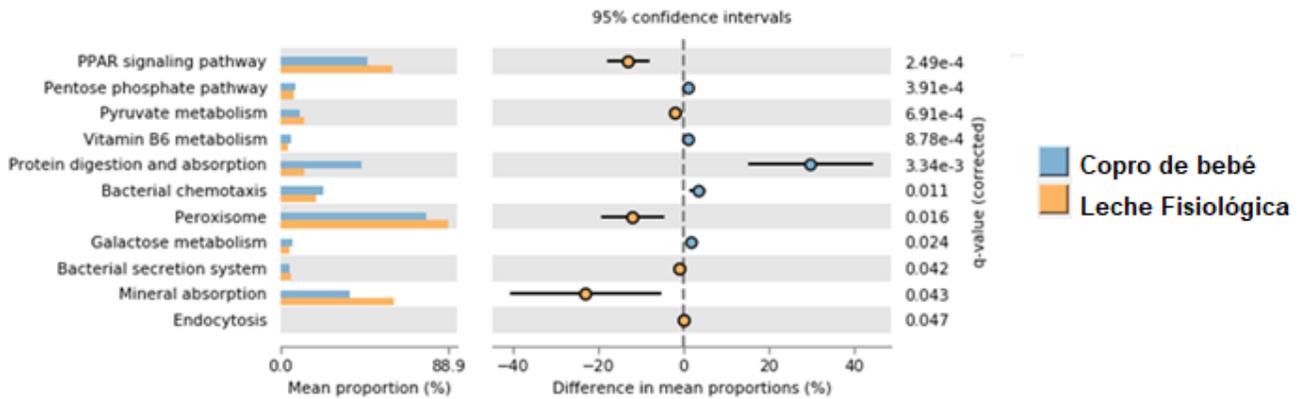


Figura 16. Variación funcional de las vías metabólicas en muestras de leche fisiológica y copro de bebé, singficativas para p y q (<0.05).

muestras poseen perfiles funcionales que se complementan. En general, nuestro análisis reveló diferencias significativas para once vías metabólicas entre ambos grupos pareados, observando en cinco de ellas un menor número de genes en el copro de bebé (Fig 16).

Las muestras de neonatos mostraron una abundancia significativamente aumentada ($p < 0.02$) de genes correspondientes al metabolismo energético, específicamente aquellos que codifican para la digestión y absorción de proteínas, el metabolismo de la galactosa, la vitamina B6 y la vía de las pentosas fosfato, así como los vinculados con la quimotaxis de bacterias. Por el contrario, las vías implicadas en la señalización de receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPAR), el peroxisoma, la absorción de minerales, el sistema de secreción bacteriana y el metabolismo del piruvato mostraron una sobrerrepresentación en la leche fisiológica ($p < 0.04$).

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo se caracterizó la microbiota de leche materna de un grupo de mujeres mexicanas, mostrando los primeros reportes en población con ancestría mexicana; estos resultados deben ser interpretados con cautela ya que para este estudio se incluyó únicamente una muestra de mujeres provenientes de Estado de México, siendo este un estudio piloto en la caracterización de la microbiota en población mexicana.

Estudios recientes han informado sobre la gran diversidad de composición microbiana en la leche humana (Jiménez et al., 2013, Collado et al., 2009, Shiao-Wen Li et al, 2017) y se ha reportado el efecto que el ambiente (área geográfica y / o estilo de vida) ejerce en la composición microbiana encontrándose que leche materna proveniente de mujeres que residen en áreas rurales presentan una comunidad microbiana significativamente más diversa en su leche que las mujeres que viven en el área urbana (Vaidya et al.,2017). Otro estudio comparativo reveló que las muestras de leche materna de mujeres españolas exhibieron una mayor diversidad que las del norte de Europa. (Kumar et al., 2016).

De manera que al comparar la leche materna de mujeres mexicanas con la de otros países se encontró qué difiere a nivel Phylum ya que proteobacteria es altamente predominante en las muestras de este estudio y reportes en países como: Suecia, Finlandia, China y España el Phylum predominante es Firmicutes (Jost et al.,2014, Cabrera-Rubio et al. Kumar et al., 2016, Sakwinska et al.,2016)

De la misma manera un estudio realizado por Davé et al., en mujeres mexicano-americanas reportó que *Streptococcus* y *Staphylococcus* fueron los grupos filogenéticos más abundantes ocupando un 85%de la abundancia relativa total, tales resultados difieren sustancialmente de los observados en este estudio donde estos géneros bacterianos solo representan un pequeño componente de la leche materna (33.18%) el resto de la diversidad bacteriana está conformado por una gran cantidad de proteobacterias como: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Kaisobacter*, bacterias de la familia Phyllobacteriaceae, Xanthomonadaceae y enterobacteriaceae, de la misma manera contiene bacterias del phylum Actinobacteria como propinobacterium y Rothia.

Esto corrobora que la ubicación geográfica y el estilo de vida tienen repercusión en la composición microbiana de la leche materna, ya que, aunque ambas poblaciones son de origen mexicano la diversidad microbiana difiere.

Estos grupos bacterianos también fueron reportados en alta proporción en estudios realizados en países como: India, Sudáfrica y Canadá. (Vaidya *et al.*,2017, Kumar *et al.*,2016, Ward *et al.*,2013).

Es posible que el efecto del ambiente y el estilo de vida en la composición microbiana de la leche materna también pueda tener efecto en el bebé debido a la transferencia bacteriana durante la lactancia, creando un sello distintivo en el microbioma intestinal del bebé y repercutiendo en la maduración del sistema inmune del infante exponiéndolo a microorganismos al que se enfrentará durante el transcurso de su vida.

Se realizó la caracterización de leche materna pasteurizada, éstas fueron muestras pareadas con leche fisiológica después de haberse sometido al tratamiento térmico de pasteurización ya que se sabe que, aunque algunos nutrientes y compuestos bioactivos presentes en la leche humana fresca permanecen activos después de dicho tratamiento térmico, la actividad biológica de otros compuestos se ve afectada en un grado variable (Peila *et al.*,2016). En el estudio previo realizado por Cacho y colaboradores, reportaron en leche pasteurizada proveniente de mujeres donadoras que los géneros más abundantes fueron *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Halomonas*; del mismo modo *Staphylococcus* estuvo presente entre las bacterias más abundantes en nuestro estudio y junto con *Pseudomonas*, *Phyllobacteriaceae* no clasificado y *Streptococcus* conformaron un 46% de la abundancia relativa total. Se sabe que bacterias del género *Staphylococcus* y *Streptococcus* son microorganismos predominantes en leche materna y son microorganismos altamente termodúricos, por lo tanto, podrían sobrevivir a la pasteurización (Cacho *et al.*,2017, Machado *et al.*2017).

Por otra parte, al comparar las muestras de ambos grupos no se encontró significancia estadística en la abundancia relativa de la microbiota en muestras pareadas de leche materna fisiológica y pasteurizada. De la misma manera los

índices de diversidad alfa y beta fueron similares en las muestras de ambos grupos de muestras, sin embargo, el índice de diversidad de Simpson muestra una diferencia indicando que la leche pasteurizada probablemente aumenta la dominancia o prevalencia de ciertos grupos bacterianos como: *Xanthobacter*, *Burkholderia*, *Enterococcus*, *Paracoccus*, *Moraxellaceae*, *Aurantimonadacea* y *bifidobacterium*.

Es importante mencionar que existe la posibilidad de que las células muertas puedan haber contribuido a la heterogeneidad bacteriana de la leche examinada como lo reporta Kable *et al.* Para eliminar este sesgo en el análisis comparativo entre las muestras, varios estudios en leche de vaca han aplicado propidium monoazide (PMA) con el propósito de distinguir células vivas y muertas y de esta manera medir solo la fracción viva de células en leche procesada o pasteurizada (Kable *et al.*,2016, Quigley *et al.*,2013).

La microbiota intestinal infantil se desarrolla desde el nacimiento hasta la madurez, estableciendo una convivencia mutuamente beneficiosa con el huésped. Como consecuencia, la microbiota intestinal del bebé es menos estable que el microbioma adulto y susceptible a la modulación o interrupción del ambiente. Como parte de este estudio, uno de los objetivos fue caracterizar y comparar la microbiota de la leche fisiológica de madres sanas, y la comunidad bacteriana presente en el intestino de sus respectivos lactantes (de hasta seis días de nacidos) alimentados exclusivamente con dicha leche con la finalidad de proporcionar datos de que bacterias de la leche materna se transfieren al intestino neonatal ya que la leche humana ha sido reconocida como una fuente fundamental de bacterias que pueden contribuir a la colonización gastrointestinal neonatal y al desarrollo y maduración inmunológica durante las primeras etapas cruciales del desarrollo infantil (Pannaj *et al.*,2017, Murphy *et al.*,2017).

Al considerar la microbiota fecal infantil, se encontró que era menos diversa que la de la leche humana independientemente de los días de nacidos, lo cual coincide con estudios previos de cohortes pequeñas y grandes que demostraron que la diversidad de la microbiota intestinal infantil es pobre en los primeros días de

nacidos y comienza a incrementarse a partir del mes (Koenig et al., 2011; Yatsunenکو et al., 2012). En este estudio encontramos una menor diversidad en la microbiota de los lactantes, independientemente de los días de nacidos, lo cual coincide con estudios previos de cohortes pequeñas y grandes que demostraron que la diversidad de la microbiota intestinal infantil es pobre en los primeros días de nacidos y comienza a incrementarse a partir del mes (Koenig et al., 2011; Yatsunenکو et al., 2012).

Los resultados de este trabajo muestran que los géneros *Pseudomonadaceae*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Enterococcus* constituyeron el grupo de bacterias más predominantes en el copro de los neonatos. Desde hace más de 20 años se conocen las diferencias en la composición de la microbiota entre niños que reciben lactancia materna o artificial (Benno et al., 1984)., reportándose ampliamente que la microbiota intestinal de recién nacidos que reciben solo lactancia materna exclusiva está dominada por *Bifidobacterias* y *Bacteroides* durante la primera semana, con una menor proporción de la familia Enterobacteriaceae (Yoshioka et al., 1983; Stark et al., 1982). Esto es debido a componentes prebióticos de la leche materna (HMOs especialmente los oligosacáridos fucosilados) que estimulan específicamente el crecimiento de estas bacterias. Otro mecanismo que permite la predominancia de estos géneros bacterianos es la selección bacteriana mediada por la expresión de glucanos fucosilados en la superficie de la mucosa intestinal infantil, la cual favorece a microorganismos que utilizan fucosa como *Bacteroides* y *Bifidobacterium* (Newburg et al., 2015, Milani et al., 2017).

Varios estudios como el Pannaj et al., han reportado la presencia del género *Pseudomonas* en los primeros 5 días de bebés alimentados con leche materna, la abundancia relativa reportada es menor que en los resultados obtenidos en este trabajo, ya que este género representó el 26.3% de la abundancia relativa total, siendo el género más abundante en nuestras muestras. Esto puede deberse a que los bebés están siendo expuestos constantemente a este tipo de bacterias en el ambiente donde se desarrollan; de igual manera se ha descrito que los LPS

(lipopolisacáridos) de bacterias gram negativas estimulan el desarrollo del sistema inmune de los lactantes (Milani *et al.*,2017).

Por otra parte, otros estudios como el de Murphy *et al.* revelan la alta abundancia relativa de géneros como: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus veillonella* y *Escherichia* ocupando un total de 71.2% de las bacterias totales, tales bacterias también se encontraron en nuestras muestras, pero en menor porcentaje (7.6%). Otras fuentes bibliográficas refieren que después del nacimiento, la microbiota intestinal de un recién nacido está dominada transitoriamente por Enterobacteriaceae y Staphylococcus, en nuestro caso estos géneros bacterianos representaron solo el 2.4% de la composición bacteriana total (Murphy *et al* 2017, Tanaka *et al.*,2017). Las comunidades fueron más similares con respecto a *Propionibacterium* lo que representó una abundancia relativa media de 4% y 3.2% en leche humana y copro de lactantes, respectivamente. Varios géneros comúnmente asociados al intestino eran comunes tanto a la leche humana como a las heces de los bebés, incluyendo *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Acinetobacter*, *Erwinia*, *Collinsella*, *Microbacterium*, *Parabacteroides*, *Kaistobacter*, *Blautia*, miembros de la familia *Lachnospiraceae* y *Phyllobacteriaceae* estos géneros representan 80% del total de lecturas. Esto concuerda con otros estudios en pares madre-lactante que han demostrado que la composición bacteriana de la microbiota fecal de los lactantes refleja la que se encuentra en la leche materna (Murphy *et al.*2017, Jimenez *et al.*,2005, Pannaraj *et al.*,2017).

En estos estudios, Martin *et al* en un estudio con 20 pares madre-lactante identificó *Staphylococcus*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* como especies predominantes en copro de bebés alimentados con leche humana, indicando estas bacterias se compartieron con frecuencia entre la leche materna y las heces de los neonatos. Jost *et al.* demostró que anaerobios obligados viables como: *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides* y miembros de Clostridia (*Blautia*, *Clostridium*, *Collinsella* y *Veillonella*) se compartieron entre las heces de la madre, la leche materna y las heces neonatales demostrando que se pueden transferir

verticalmente de la madre al recién nacido a través de la lactancia (Jost *et al* 2014, Martin *et al.*, 2015).

Estos resultados apoyan a el hecho que la leche materna constituye una importante fuente de una gran diversidad de bacterias para el infante, mismas que pueden ser potencial colonizadores del intestino neonatal en etapas tempranas y a su vez fomentar inmunidad en el lactante contribuyendo a un desarrollo saludable.

Por último, los datos obtenidos del análisis metabólico de PICRUST nos indican algunas vías metabólicas elevadas significativamente, tal es el caso de algunas vías de metabolismo de carbohidratos como: vía de las pentosas fosfato, metabolismo de piruvato y Galactosa.

Se ha descrito que una proporción considerable de bifidobacterias presentes en el intestino del lactante, son capaces de metabolizar los oligosacáridos de la leche materna a partir de la lactosa (Sela *et al.*, 2008; Milani *et al.*, 2015). Estas bacterias promueven el metabolismo de los carbohidratos a través de la glicólisis, por medio de la cual la lactosa procedente de la leche materna es degradada de forma anaerobia a piruvato, éste a su vez sirve de sustrato para la generación de energía a través de la vía de las pentosas. Este comportamiento es el esperado porque el metabolismo energético de los neonatos es elevado para poder suplir sus requerimientos nutricionales, los cuales provienen únicamente de la leche. Un estudio reciente realizado sobre las secuencias del genoma de cepas pertenecientes a 47 especies de *Bifidobacterium* encontró que el 5,5% de las secuencias genómicas codificadoras para bifidobacteria se asocian con el metabolismo de los carbohidratos (Milani *et al.*, 2015). En este estudio la abundancia relativa para el género Bifidobacterias fue significativamente mayor en el copro de bebé que en la leche fisiológica (0.21% vs 11.93%, $p=0.015$) mientras que los genes vinculados al metabolismo de la galactosa y el ciclo de las pentosas también mostraron significativamente mayor representatividad que en la leche fisiológica. Según lo reportado por Backhed *et al.* 2015, entre los genes que se encuentran sobre-expresados en la microbiota de los neonatos lactantes están los

vinculados con las vías metabólicas de las pentosas, la galactosa, el piruvato, y las vitaminas, así como los genes de la digestión y absorción de proteínas, lo cual también coincide con nuestros hallazgos.

Con respecto al receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR), el mismo ha sido identificado como el principal regulador del metabolismo de los lípidos hepáticos (incluida la β -oxidación y la cetogénesis de los ácidos grasos) y también desempeña un papel en el metabolismo de la glucosa, los aminoácidos y las lipoproteínas (Rakhshandehroo et al., 2010). Por ejemplo, los ratones con ausencia de PPAR α , muestran un aumento de aminoácidos circulantes y urea (Contreras et al., 2005). Nosotros encontramos mayor aumento de estos genes en la leche materna en comparación con el copro. El aumento de actividad de PPAR α en las madres en comparación con sus lactantes se explicaría por los altos requerimientos para la síntesis de lípidos que son transportados en la leche. Hasta donde tenemos conocimiento, nuestro estudio es el primero en informar el análisis de microbiomas y la identificación de una mayor riqueza y diversidad de especies en la leche fisiológica en comparación con la microbiota de neonatos de una semana de nacidos alimentados con lactancia materna exclusiva.

IX. CONCLUSIONES

1. La leche materna de mujeres mexicanas sanas contiene una alta frecuencia de los Phylas Proteobacteria y Firmicutes (52 y 32% respectivamente) y taxones microbianos como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Propionibacterium* y *Bifidobacteriaceae*.
2. La pasteurización modifica la homogeneidad de grupos bacterianos de la leche fisiológica.
3. La composición bacteriana de la leche humana es significativamente más abundante que la microbiota del intestino neonatal, al menos, durante los primeros seis días de vida.
4. Se encontraron rutas metabólicas significativamente diferentes entre muestras de leche materna y copro de lactantes como: vías de metabolismo de carbohidratos, quimiotaxis bacteriana, la vía de PPAR α y vitamina B6.

X. PERSPECTIVAS

- 1) Realizar caracterización de microbiota en heces de lactantes alimentados con leche materna pasteurizada de banco de leche.
- 2) Incrementar el número de muestras de pares de leche materna y leche pasteurizada.
- 3) Incrementar los pares de leche materna y copro de neonatos para tener un mayor peso estadístico

XI. BIBLIOGRAFÍA

- American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 2012;129(3):e827-e841.
- Arslanoglu, S., Ziegler, E. E., & Moro, G. E. (2010). Donor human milk in preterm infant feeding: evidence and recommendations. *Journal of perinatal medicine*, 38(4), 347-351.
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., & Khan, M. T. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell host & microbe*, 17(5), 690-703.
- Björkstén, B. B. L. G., Burman, L. G., De Chateau, P., Fredrikzon, B. O., Gothefors, L., & Hernell, O. (1980). Collecting and banking human milk: to heat or not to heat?. *Br Med J*, 281(6243), 765-769.
- Blázquez, M. (2017). Anatomía de la mama durante la lactancia. [online] Curso de Medicina Naturista-2003. Available at: http://www.unizar.es/med_naturista/lactancia%203/Anatomia%20y%20Fisiologia.pdf [Accessed 9 Jun. 2017].
- Cabrera-Rubio R., Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*. 96(3):544-51.
- Cacho, N. T., Harrison, N. A., Parker, L. A., Padgett, K. A., Lemas, D. J., Marcial, G. E., ... & Lorca, G. L. (2017). Personalization of the microbiota of donor human milk with mother's own milk. *Frontiers in microbiology*, 8, 1470.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6), 1258-1270.
- Contreras, A. V., Rangel-Escareño, C., Torres, N., Alemán-Escondrillas, G., Ortiz, V., Noriega, L. G., ... & González-Hirschfeld, D. (2015). PPAR α via HNF4 α regulates the expression of genes encoding hepatic amino acid catabolizing enzymes to maintain metabolic homeostasis. *Genes & nutrition*, 10(2), 3.

- Danforth KN, Tworoger SS, Hecht JL, Rosner BA, Colditz GA, Hankinson SE. (2007). Breastfeeding and risk of ovarian cancer in two prospective cohorts. *Cancer Causes Control*. 18(5)517–523.
- Davé V., Street K, Francis S, Bradman A, Riley L, Eskenazi B, Holland N. (2016). Bacterial microbiome of breast milk and child saliva from low income Mexican-American women and children. *Pediatr. Res* 79(6):846-54.
- De León Luna, G. (2012). Propuesta de una guía educativa para la utilización y promoción del Banco de Leche Humana dirigida al personal de salud del Hospital Regional de Zacapa. Licenciatura en Nutrición. Universidad Rafael Landívar Facultad DE Ciencias De La Salud.
- de Segura, A. G., Escuder, D., Montilla, A., Bustos, G., Pallás, C., Fernández, L., ... & Rodríguez, J. M. (2012). Heating-induced bacteriological and biochemical modifications in human donor milk after holder pasteurisation. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 54(2), 197-203.
- Feher, S. D., Berger, L. R., Johnson, J. D., & Wilde, J. B. (1989). Increasing breast milk production for premature infants with a relaxation/imagery audiotape. *Pediatrics*, 83(1), 57-60.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., & Rodríguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 1-10.
- Fitzstevens, J. L., Smith, K. C., Hagadorn, J. I., Caimano, M. J., Matson, A. P., & Brownell, E. A. (2016). Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutrition in Clinical Practice*, 0884533616670150.
- García-Mena J, Murugesan S, Pérez-Muñoz AA, García-Espitia M, Maya O, Jacinto-Montiel M, Monsalvo-Ponce G, Piña-Escobedo A, Domínguez-Malfavón L, Gómez-Ramírez M, Cervantes-González E, Núñez-Cardona MT. (2016) Airborne Bacterial Diversity from the Low Atmosphere of Greater Mexico City. *Microb Ecol*. 72(1):70-84.
- Gobierno del Estado de México. (2017). Bancos de leche humana . 30/05/2017, de Secretaría de Salud Sitio web: http://salud.edomexico.gob.mx/html/celmb/ep_bancos_lh.html

- Gomez-Gallego C., Garcia-Mantrana I, Salminen S, Collado MC. (2016). The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*.21(6):400-405.
- Hartmann, B. T., Pang, W. W., Keil, A. D., Hartmann, P. E., & Simmer, K. (2007). Best practice guidelines for the operation of a donor human milk bank in an Australian NICU. *Early human development*, 83(10), 667-673.
- Hunt, KM., et al. (2011). Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLoS ONE*. 6(6): e21313.
- Jiménez E, De Andrés J, Manrique M, Pareja-Tobes P, Tobes R, Martínez-Blanch JF, Codoñer FM, Ramón D, Fernández L, Rodríguez JM (2015). Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women. *J Hum Lact*. 31(3):406–15.
- Jiménez E, Delgado S, Fernández L, García N, Albújar M, Gómez A, Rodríguez JM. (2008). Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Res in Microbiol*. 159 (9-10): 595-601.
- Jiménez, E., Delgado, S., Maldonado, A., Arroyo, R., Albújar, M., García, N., ... & Rodríguez, J. M. (2008). *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC microbiology*, 8(1), 143.
- Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr Rev* 2015;73(7):426e37.
- Jost T., Lacroix C, Braegger C, Chassard C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture dependent and culture independent approaches. *Br. J. Nutr*. 110(7):1253-62.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Rochat, F., & Chassard, C. (2014). Vertical mother–neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental microbiology*, 16(9), 2891-2904.
- Kable, M. E., Srisengfa, Y., Laird, M., Zaragoza, J., McLeod, J., Heidenreich, J., & Marco, M. L. (2016). The core and seasonal microbiota of raw bovine

milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *MBio*, 7(4), e00836-16.

- Klindworth A, Priesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41:e1-e1.
- Kultima JR, Coelho LP, Forslund K, Huerta-Cepas J, Li SS, Driessen M, Voight AY, Zeller G, Sunagawa S, Bork, P. (2016). MOCAT2: a metagenomic assembly, annotation and profiling framework. *Bioinformatics* 32: 2520–2523.
- Lam EY, Kecskés Z, Abdel-Latif ME. (2012). Breast milk banking: Current opinion and practice in Australian neonatal intensive care units. *J Paediatrics & Child Health*. 48(9):833-9.
- Machado, S. G., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M. C., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2017). The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Frontiers in microbiology*, 8, 302.
- Mandard, S., Müller, M., & Kersten, S. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(4), 393-416.
- Marín, M. L., Arroyo, R., Jiménez, E., Gómez, A., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2009). Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 49(3), 343-348.
- Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics* 2003;143:754–8. [5] Heikkilä MP, Saris
- Martin R. Heilig HG, Zoetendal EG, Jiménez E, Fernández L, Smidt H, Rodríguez JM. (2007). Cultivation independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res in Microbiol*. 158(1):31-7.
- Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín ML., Reviriegoa C, Jiménez E, Marín ML, Olivares M, Boza J, Jiménez J, Fernández L, Xaus J,

and Rodríguez JM. (2004). The commensal microflora of human milk. *Trends Food Sci Tech.* 15: 121-127.

- Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R. D., Fernández, L., ... & Jiménez, E. (2012). Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of Human Lactation*, 28(1), 36-44.
- McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, Andersen GL, Knight R, Hugenholtz P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 6(3):610-8
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., ... & Lugli, G. A. (2017). The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews*, 81(4), e00036-17.
- Morrow AL, Rangel JM. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 2004;:221–8.
- Newburg, D. S. (2005). Innate immunity and human milk. *The Journal of nutrition*, 135(5), 1308-1312.
- Newburg, D. S., & Morelli, L. (2014). Human milk and infant intestinal mucosal glycans guide succession of the neonatal intestinal microbiota. *Pediatric research*, 77(1-2), 115.
- Osorio LM. And Umbarila AS. Microbiota de la glándula mamaria. (2015). *Pediatr.* 48(1):1-8.
- Peila, C., Moro, G. E., Bertino, E., Cavallarin, L., Giribaldi, M., Giuliani, F., ... & Coscia, A. (2016). The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: A review. *Nutrients*, 8(8), 477.
- Penders, J., Vink, C., Driessen, C., London, N., Thijs, C., & Stobberingh, E. E. (2005). Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and

Clostridium difficile in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS microbiology letters*, 243(1), 141-147.

- Quigley, L., McCarthy, R., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., ... & Cotter, P. D. (2013). The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *Journal of dairy science*, 96(8), 4928-4937.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolín M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology* 2001;2:361–7.
- Rodríguez, J. M., Jiménez, E., Merino, V., Maldonado, M. L., Marín, M. L., Fernández, L., & Martín, R. (2008). Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. *Acta Pediatr Esp*, 66(2), 77-82.
- Rosenblatt KA, Thomas DB. (1995). Prolonged lactation and endometrial cancer. WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Int J Epidemiol*. 24(3):499-503.
- Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, Hoon J, Simons JF, Marran D, Myers JW, Davidson JF, Branting A, Nobile JR, Puc BP, Light D, Clark TA, Huber M, Branciforte JT, Stoner IB, Cawley SE, Lyons M, Fu Y, Homer N, Sedova M, Miao X, Reed B, Sabina J, Feierstein E, Schorn M, Alanjary M, Dimalanta E, Dressman D, Kasinskas R, Sokolsky T, Fidanza JA, Namsaraev E, McKernan KJ, Williams A, Roth GT, Bustillo J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 20; 475(7356):348-52.
- Sakata S, Tonooka T, Ishizeki S, Takada M, Sakamoto M, Fukuyama M, Benno Y: Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to *Bifidobacterium* species. *FEMS Microbiol Lett* 2005, 243:417–423.
- Sakwinska, O., Moine, D., Delley, M., Combremont, S., Rezzonico, E., Descombes, P., ... & Thakkar, S. K. (2016). Microbiota in Breast Milk of Chinese Lactating Mothers. *PloS one*, 11(8), e0160856.

- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*, 12(6), R60.
- Sela, D. A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J. H., Chen, F., Whitehead, T. R., ... & Price, N. P. (2008). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(48), 18964-18969.
- Shin, J., Lee, S., Go, M. J., Lee, S. Y., Kim, S. C., Lee, C. H., & Cho, B. K. (2016). Analysis of the mouse gut microbiome using full-length 16S rRNA amplicon sequencing. *Scientific Reports*, 6.
- Stark, P. L., & Lee, A. (1982). The microbial ecology of the large bowel of breastfed and formula-fed infants during the first year of life. *Journal of medical microbiology*, 15(2), 189-203.
- Urbaniak C, Angelini M, Gloor GB, Reid G. (2016). Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome*. 4(1):1–9. doi: 10.1186/s40168-015-0145-y.
- Vaidya, Y. H., Patel, S. H., Patel, R. J., Pandit, R. J., Joshi, C. G., & Kunjadia, A. P. (2017). Human milk microbiome in urban and rural populations of India. *Meta Gene*, 13, 13-22.
- Van Gysel, M., Cossey, V., Fieuw, S., & Schuermans, A. (2012). Impact of pasteurization on the antibacterial properties of human milk. *European journal of pediatrics*, 171(8), 1231-1237.
- Ward, T. L., Hosid, S., Ioshikhes, I., & Altosaar, I. (2013). Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC microbiology*, 13(1), 116
- Yoshioka, H., Iseki, K. I., & Fujita, K. (1983). Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics*, 72(3), 317-321.

XII. ANEXOS

Anexo A

Tabla completa de “barcodes” utilizados en la preparación de genotecas de 16S rDNA de las muestras de leche materna y copro

NAME OF PRIMER	ION TORRENT LINKER	GOLAY BARCODE	SPACER	16S rRNA Primer (5'-3')
V3-341 F1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GATCTGCGATCC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAGTCTATCAGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAAACAACAGCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCAACACCATCC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCGATATATCGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGAGCAATCCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTCGTGCACAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GTATCTGCGCGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGAGGGAAAGTC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAAATTCGGGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGATTGACCAAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTTACGAGCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCATATGCACTG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAACTCCCCTGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGCGTTAGCAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TACGAGCCCTAA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CACTACGCTAGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGCAGTCTCGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCATAGCTCCG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGGACATCTCTT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GAACACTTTGGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GAGCCATCTGTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGGGTACACGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGGCCTCCTT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TAATACGGATCG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGGAAATTAGAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGTGAATTCGGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CATTCTGGCGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F29	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AACGCACGCTAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F30	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACACTGTTTATG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F31	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCAGACGATGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F32	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGCTCATGGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F33	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTACGGTATG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F34	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGACCGTCAGAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F35	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCACCAGCCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F36	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACAGACCACTCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F37	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCAGCGACTAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F38	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGGATCGTCAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F39	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTTGACAGCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F40	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AACTGTGCGTAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F41	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCGCAGAGTCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F42	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGGTGAGTGTC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F43	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTCGATTGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F44	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGACTGCGTACT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F45	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCAGTCGCGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F46	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGGACGCACTGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F47	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGAGATGTGCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F48	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACAGCAGTGGTC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F49	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGTACTCAGTG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F50	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTCGCACAGGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-518 R	CCTCTATGGGAGTCGGTGAT	NOT APPLICABLE	CC	ATTACCGGCGTGTGG

Anexo B

Tablas de pruebas estadísticas para comparación de diversidad alfa entre muestras

Tabla 1. Comparación de los índices de diversidad alfa entre muestras de leche fisiológica y pasteurizada

Índices de diversidad	L. Fisiológica N=42	L. Pasteurizada N=42	Valor de P*
Observada	572±397.3	493.3±240.2	0.871
Chao	904.8±608.5	787.2±367.8	0.604
Shannon	2.82±0.83	2.93±0.55	0.124
Simpson	0.81±0.12	0.86±0.88	0.03

*

Valor de p para la prueba de rangos de Wilcoxon ($p < 0.05$)

Tabla 2. Comparación de los índices de diversidad alfa entre muestras de leche fisiológica y copro de bebé.

Índices de diversidad	L. Fisiológica N=20	Copro Bebé N=20	Valor de P*
-----------------------	------------------------	--------------------	-------------

Observada	500.50	333.25	0.023
Chao	53.49	45.039	0.048
Shannon	2.35	1.92	0.332
Simpson	0.6973	0.6254	0.502

* Valor de p para la prueba de rangos de Wilcoxon ($p < 0.05$)

Anexo C

Fasting map de las muestras usadas en este estudio

Tabla 1. Fasting map de las muestras usadas en este estudio

#Sample ID	Barcode Sequence	Linker Primer Sequence	InputFileName	Group
LP7	CAGCTCATCAG C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F2.trimm.fna	PAS
LP8	CAAACAACAGC T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F3.trimm.fna	PAS
LP13	GCAACACCATC C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F4.trimm.fna	PAS
LP14	GCGATATATCG C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F5.trimm.fna	PAS
LP17	CGAGCAATCCT A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F6.trimm.fna	PAS
LP19	AGTCGTGCACA T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F7.trimm.fna	PAS
LF19	GTATCTGCGCG T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F8.trimm.fna	RAW
LP24	CGAGGGAAAG TC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F9.trimm.fna	PAS
LP25	CAAATTCGGGA T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F10.trimm.fna	PAS

LF39	AGATTGACCA C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F11.trimm.fna	RAW
LP67	AGTTACGAGCT A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F12.trimm.fna	PAS
LF67	GCATATGCACT G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F13.trimm.fna	RAW
LF93	CAACTCCCGTG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F14.trimm.fna	RAW
LF94	TTGCGTTAGCA G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F15.trimm.fna	RAW
LP5	TACGAGCCCTA A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F16.trimm.fna	PAS
LF240	TGCAGTCCTCG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F18.trimm.fna	RAW
LP240	ACCATAGCTCC G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F19.trimm.fna	PAS
LF275	TGGACATCTCT T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F20.trimm.fna	RAW
LP275	GAACACTTTGG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F21.trimm.fna	PAS
LF290	GAGCCATCTGT A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F22.trimm.fna	RAW
LP290	TTGGGTACACG T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F23.trimm.fna	PAS
CB14	AAGGCGCTCCT T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F24.trimm.fna	BABY_STO OL
CB17	TGTGAATTCGG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F27.trimm.fna	BABY_STO OL
CB19	CATTCGTGGCG T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F28.trimm.fna	BABY_STO OL
CB28	AACGCACGCTA G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F29.trimm.fna	BABY_STO OL
CB63	ACACTGTTTAT G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F30.trimm.fna	BABY_STO OL

CB67	ACCAGACGATG C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F31.trimm.fna	BABY_STO OL
CB99	ACGCTCATGGA T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F32.trimm.fna	BABY_STO OL
CB101	ACTCACGGTAT G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F33.trimm.fna	BABY_STO OL
CB103	AGACCGTCAGA C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F34.trimm.fna	BABY_STO OL
CB108	AGCACGAGCCT A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F35.trimm.fna	BABY_STO OL
CB119	ACAGACCACTC A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F36.trimm.fna	BABY_STO OL
CB155	ACCAGCGACTA G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F37.trimm.fna	BABY_STO OL
CB275	AGCTTGACAGC T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F39.trimm.fna	BABY_STO OL
CB290	ACCGCAGAGTC A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 1_F41.trimm.fna	BABY_STO OL
LF5	CAGCTCATCAG C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F2.trimm.fna	RAW
LF7	CAAACAACAGC T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F3.trimm.fna	RAW
LF13	GCAACACCATC C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F4.trimm.fna	RAW
LF8	GCGATATATCG C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F5.trimm.fna	RAW
LF17	CGAGCAATCCT A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F6.trimm.fna	RAW
LF24	GTATCTGCGCG T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F8.trimm.fna	RAW
LP57	CGAGGGAAAG TC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F9.trimm.fna	PAS
LF29	AGATTGACCAA C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F11.trimm.fna	RAW

LF57	AGTTACGAGCT A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F12.trimm.fna	RAW
LF14	GCATATGCACT G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F13.trimm.fna	RAW
LP39	CAACTCCCGTG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F14.trimm.fna	PAS
LP29	TACGAGCCCTA A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F16.trimm.fna	PAS
LP30	CACTACGCTAG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F17.trimm.fna	PAS
LP94	TGCAGTCCTCG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KC- 2_F18.trimm.fna	PAS
LP93	GATCTGCGATC C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F1.trimm.fna	PAS
LF25	CAGCTCATCAG C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F2.trimm.fna	RAW
LF188	CAAACAACAGC T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F3.trimm.fna	RAW
LP188	GCAACACCATC C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F4.trimm.fna	PAS
LP28	GCGATATATCG C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F5.trimm.fna	PAS
LF28	CGAGCAATCCT A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F6.trimm.fna	RAW
LF30	AGTCGTGCACA T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F7.trimm.fna	RAW
LF41	GTATCTGCGCG T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F8.trimm.fna	RAW
LF108	CGAGGGAAAG TC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F9.trimm.fna	RAW
LP41	CAAATTCGGGA T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F10.trimm.fna	PAS
LF42	AGATTGACCAA C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F11.trimm.fna	RAW

LP42	AGTTACGAGCT A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F12.trimm.fna	PAS
LF55	GCATATGCACT G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F13.trimm.fna	RAW
LP55	CAACTCCCGTG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F14.trimm.fna	PAS
LF63	TTGCGTTAGCA G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F15.trimm.fna	RAW
LP63	TACGAGCCCTA A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F16.trimm.fna	PAS
LF71	CACTACGCTAG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F17.trimm.fna	RAW
LP71	TGCAGTCCTCG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F18.trimm.fna	PAS
LF77	ACCATAGCTCC G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F19.trimm.fna	RAW
LP77	TGGACATCTCT T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F20.trimm.fna	PAS
LF99	GAACACTTTGG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F21.trimm.fna	RAW
LP99	GAGCCATCTGT A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F22.trimm.fna	PAS
LF101	TTGGGTACACG T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F23.trimm.fna	RAW
LP101	AAGGCGCTCCT T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F24.trimm.fna	PAS
LF103	TAATACGGATC G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F25.trimm.fna	RAW
LP103	TCGGAATTAGA C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F26.trimm.fna	PAS
LP108	TGTGAATTCGG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F27.trimm.fna	PAS
LF119	CATTCGTGGCG T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F28.trimm.fna	RAW

LP119	AACGCACGCTA G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F29.trimm.fna	PAS
LF155	AACTGTTTCAT G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F30.trimm.fna	RAW
LP155	ACCAGACGATG C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F31.trimm.fna	PAS
LF159	ACGCTCATGGA T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F32.trimm.fna	RAW
LP159	ACTCACGGTAT G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F33.trimm.fna	PAS
LF164	AGACCGTCAGA C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F34.trimm.fna	RAW
LP164	AGCACGAGCCT A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F35.trimm.fna	PAS
LF167	ACAGACCACTC A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F36.trimm.fna	RAW
LP167	ACCAGCGACTA G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F37.trimm.fna	PAS
LF181	ACGGATCGTCA G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F38.trimm.fna	RAW
LP181	AGCTTGACAGC T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F39.trimm.fna	PAS
LF183	AACTGTGCGTA C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F40.trimm.fna	RAW
LP183	ACCGCAGAGTC A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F41.trimm.fna	PAS
LF184	ACGGTGAGTGT C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F42.trimm.fna	RAW
LP184	ACTCGATTCGA T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F43.trimm.fna	PAS
LF185	AGACTGCGTAC T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F44.trimm.fna	RAW
LP185	AGCAGTCGCGA T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F45.trimm.fna	PAS

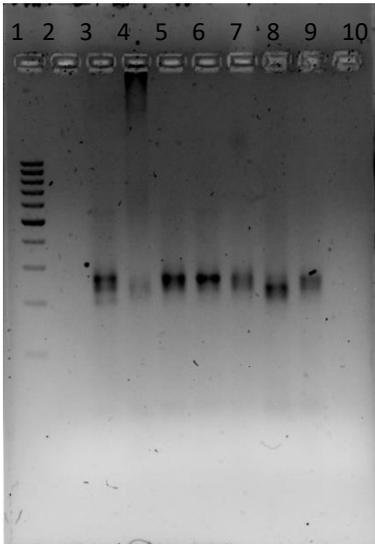
LF187	AGGACGCACTG T	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F46.trimm.fna	RAW
LP187	AAGAGATGTCG A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F47.trimm.fna	PAS
LF192	ACAGCAGTGGT C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F48.trimm.fna	RAW
LP192	ACGTACTCAGT G	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGA CTCAG	KI- 3_F49.trimm.fna	PAS

Anexo D

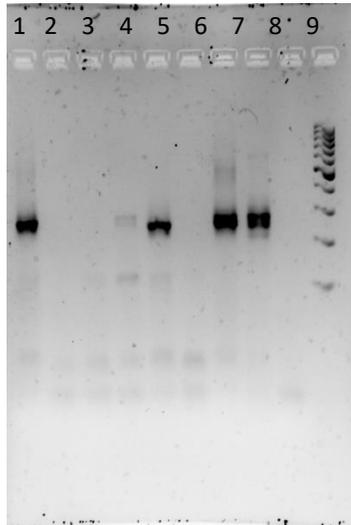
Productos de la amplificación de región V3 del rRNA 16S por PCR con barcode.

Los siguientes geles son Geles de agarosa al 2% teñidos con Midori Green, estos contienen los amplicones de un tamaño de 230 Pb correspondiente a la región V3 del rRNA 16s. Los geles están clasificados por Chip de secuenciación.

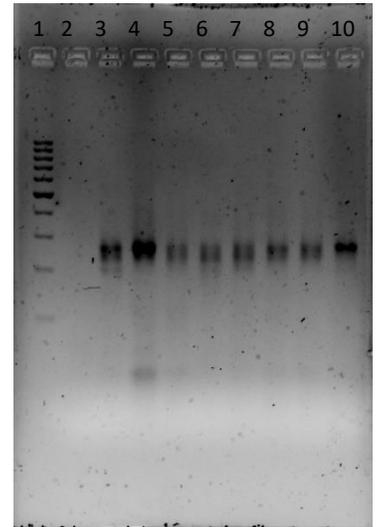
CHIP DE SECUENCIACIÓN 1



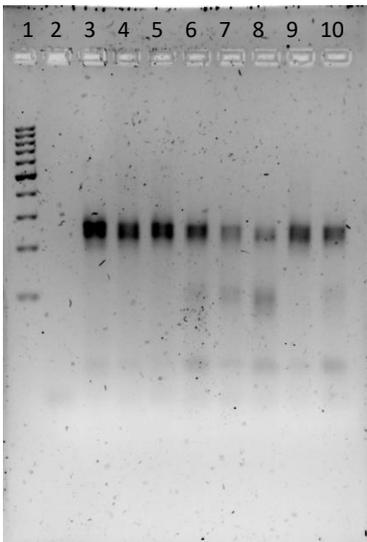
Carril 1 MPM, **2.** CN, **3.** CP **4.** LF228
5. LP7 **6.** LP8 **7.** LP13 **8.** LP14 **9.** LP17
10. LP228



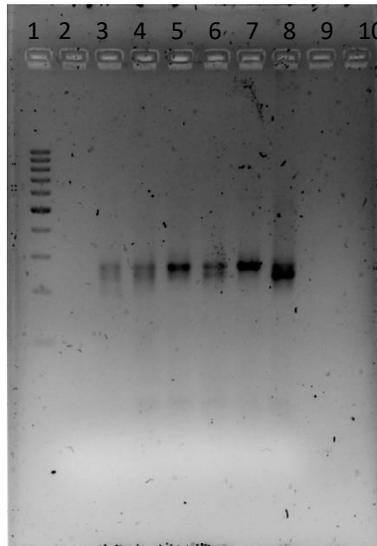
1. MPM, **2.** CN, **3.** CP, **4.** CB101, **5.** CB103,
6. CB108, **7.** CB119, **8.** CB155, **9.** CB228, **10.** LP19



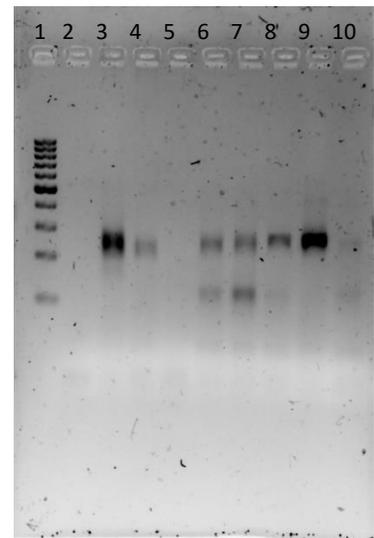
1. MPM, **2.** CN, **3.** CP, **4.** LF19, **5.** LP24,
6. LP25, **7.** LF39 **8.** LP67, **9.** LF67, **10.** LF93



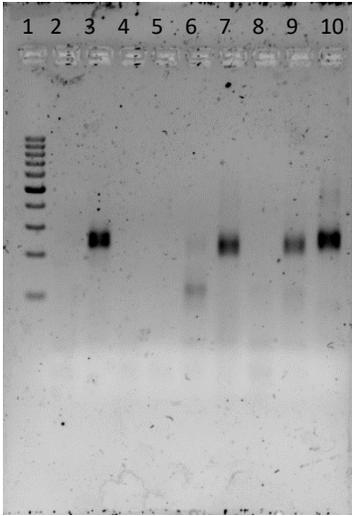
1. MPM, **2.** CN, **3.** CP, **4.** LF94, **5.** LP5, **6.** LF240,
7. LF275, **8.** LP275, **9.** LF290



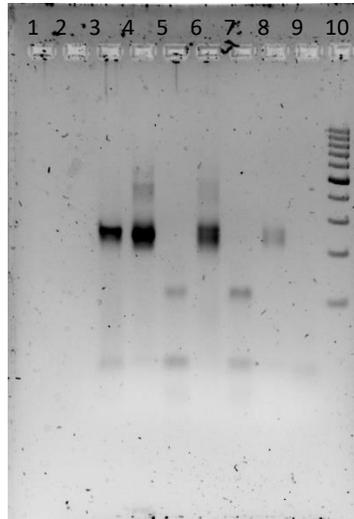
1. MPM **2.** CN **3.** CP **4.** LP290 **5.** CB14
6. CB66 **7.** CB15 **8.** CB17



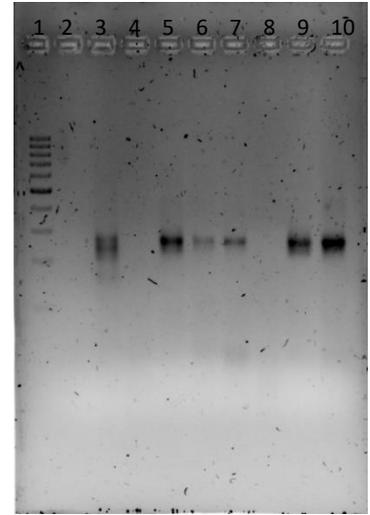
1. MPM **2.** CN **3.** CP **4.** LF228 **5.** LP228
6. CB19 **7.** CB63 **8.** CB103, **9.** CB119 **10.** CB155



1.MPM 2.CN 3.CP 4.CM14 5.CM17 6.CB155
7.CM23,8.CB65 9.LF78 10.CB78

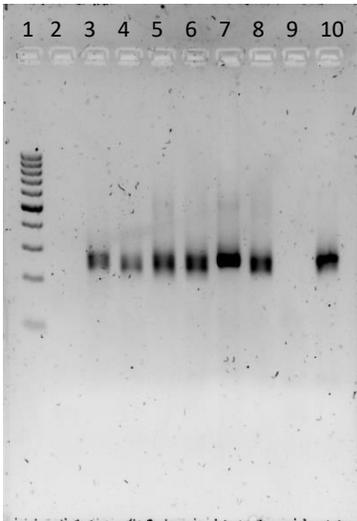


1.MPM 2.CN 3.CP 4.CB19 5.CB28
6.CB63 7.CB67 8.CB99

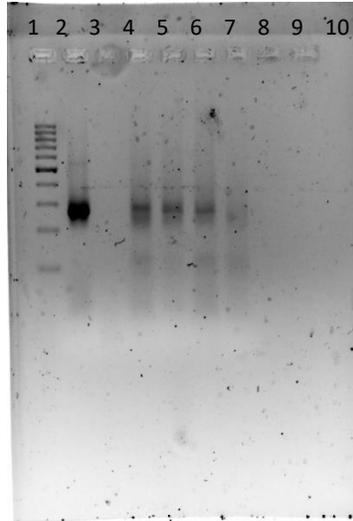


1.MPM 2.CN 3.CP 4.CB228 5.CB275
6.CB275O 7.CB290 8.CB290O 9.LF49
10.CB49

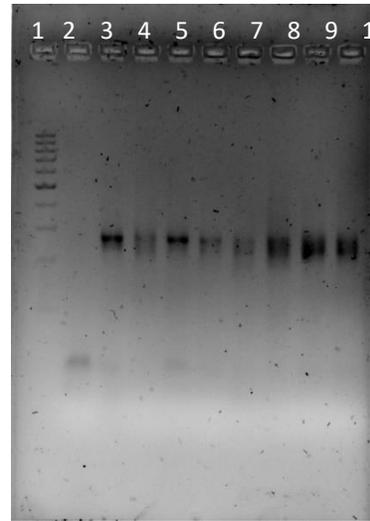
CHIP DE SECUENCIACIÓN 2



1.MPM 2.CN 3.CP 4.LF23 5.CB23
6.LF64 7.CB64 8.LF65 9.CB65
10.LF66

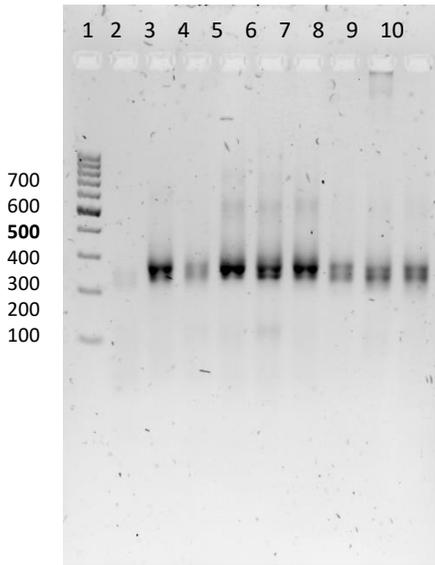


1.MPM 2.CP 3.CN 4.LF5 5.LF7
6.LF8 7.LF14

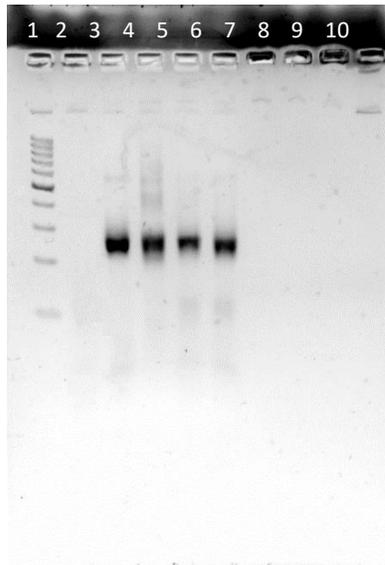


1.MPM 2. CN 3. CP 4.LF168 5.LP168
6.LF17 7.LP15 8.CB68 9.LP39 10.CB106

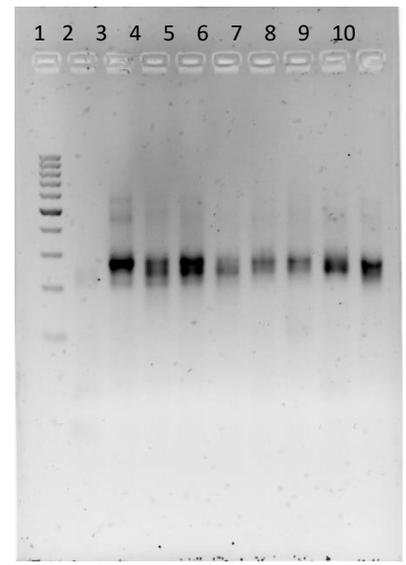
CHIP DE SECUENCIACIÓN 3



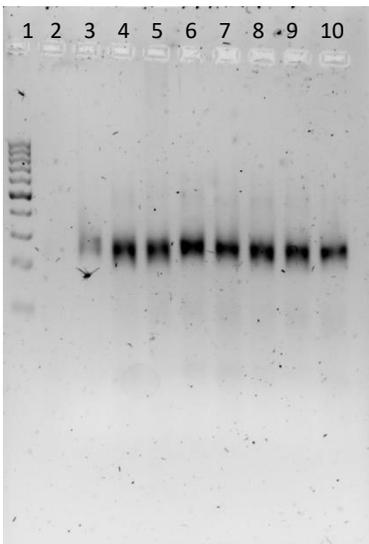
1.MPM 2.CN 3. CP 4.LP93 5.LF30,
6.LF41 7.LP57 8.LP41 9.LF42 10.LF55



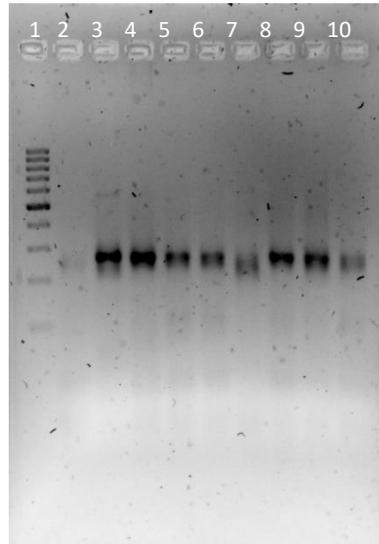
1.MPM 2.CN 3.CP 4.CB28 5.LF28
6.LP28



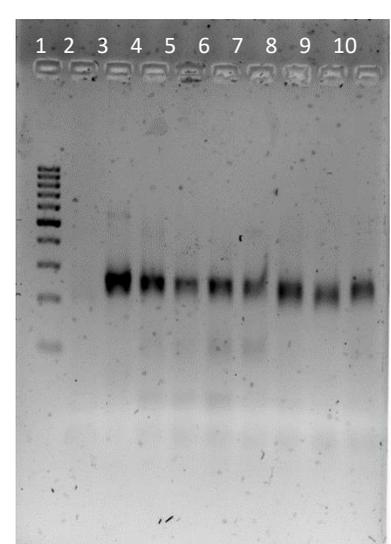
1.MPM 2.CN 3.CP 4. LP55 5.LF63
6.LP63 7.LF71 8.LP71 9.LF77 10.LP42



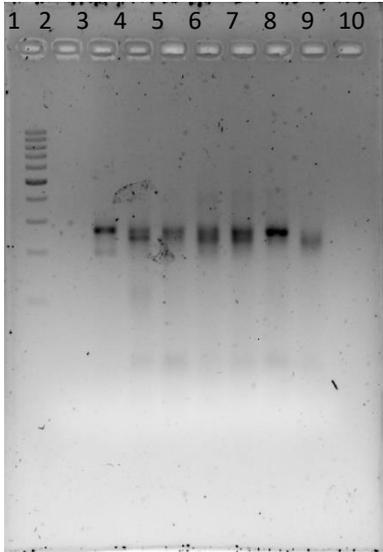
1.MPM 2.CN, 3.CP 4.LP77 5.LF99
6.LP99 7.LF101 8.LP101 9.LF103 10.LP103



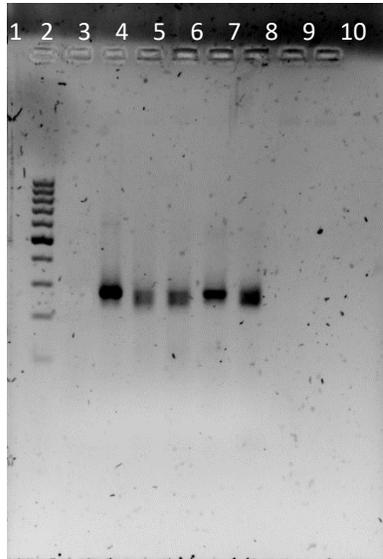
1.MPM 2.CN 3.CP 4.LF108 5.LP108
6.LF119 7.LP119 8.LF155 9.LP155
10.LF159



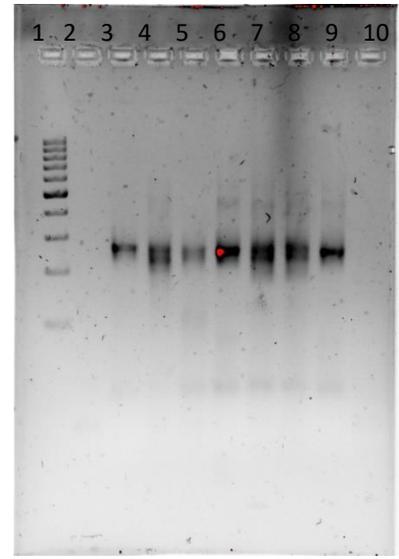
1.MPM 2.CN 3.CP 4.LP159 5.LF164
6.LP164 7.LF167 8.LP167 9.LF181
10.LP181



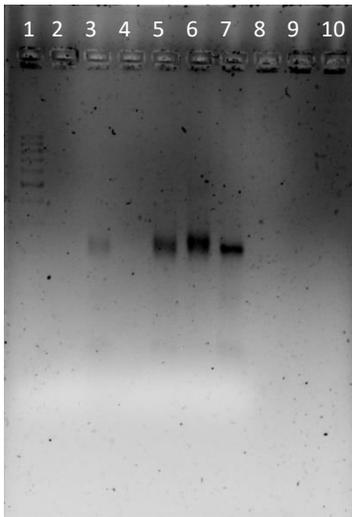
1.MPM 2.CN 3.CP 4.LF183 5.LP183 6.LF184
7.LP184 8.LF185 9.LF187



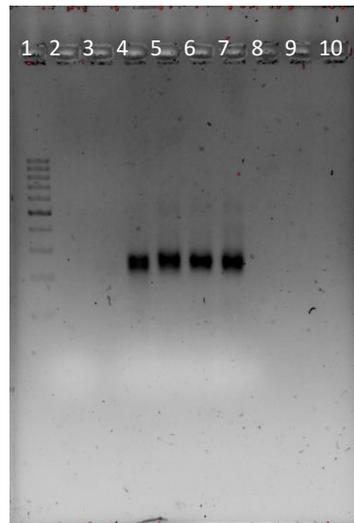
1.MPM 2.CN 3.CP 4.LP187 5.LF192
6.LP1927.LP185(45)



1.MPM 2.CN 3.CP 4.LF188 5.LP188 6.
LP240 7.LP30 8.LP30 9.LP29



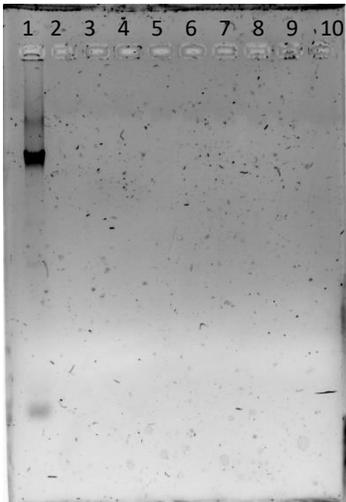
1.MPM 2.CN 3.CP 4.LF30
5.LF25 6.LF13 7.LF24



1.MPM 2.CP 3.CN 4.LF66 5.LF29
6.LF57 7.LP94

Anexo E

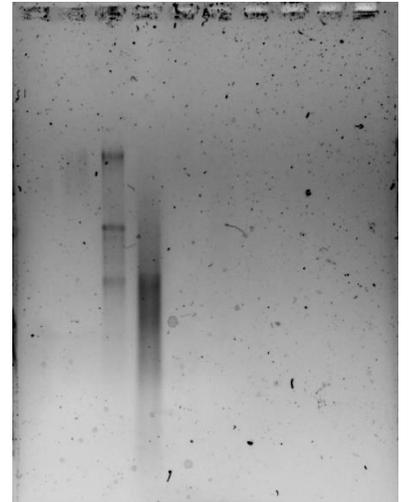
Geles de agarosa al 0.5% teñidos con Midori Green de DNA genómico de muestras de leche materna fisiológica, leche materna pasteurizada y copro de bebé.



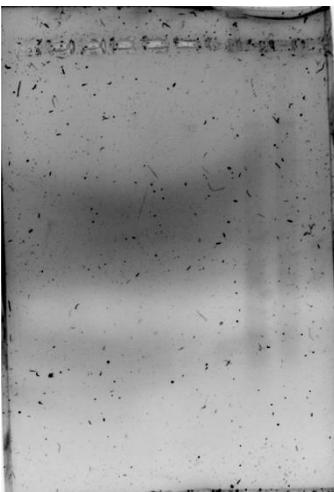
1.LP5 2.LF5, 3.LF7 4.LF7 5.LP188
6.LF188 7.LP30 8.LP30 9.LP29 10.LF29



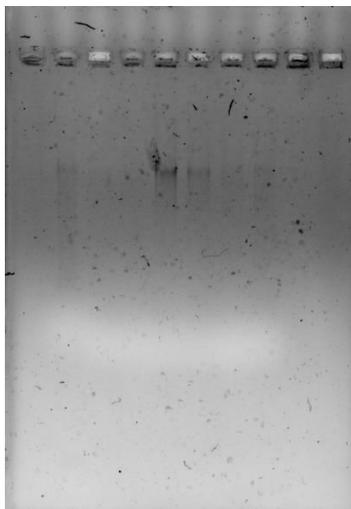
1.LF8,2.LP8,3.LF13,4.LP13,5.LF14,
6.LP14,7.CB14,8.LF17,9.LP17,
10.LF71



1.LF19,2. LP19,3.CB19, 4.LF24,5.LP24
,6.LF25, 7.LP25,8LF28,9.LP28,10.CB28



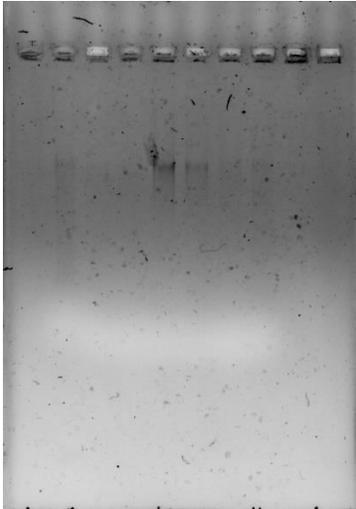
1.LF29,2.LP29,3.LF30,4.LP30,5.LF3
9,6.LP39,7.LF39,8.LP39,9.LF41,10.
LP41



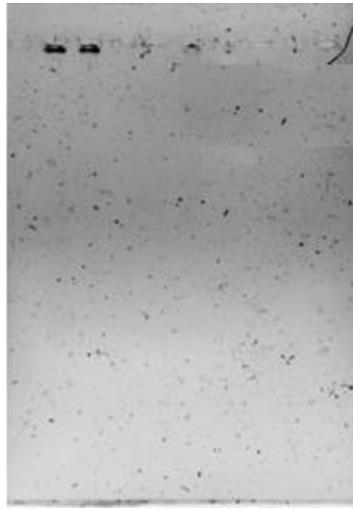
1.LF55,2.LP55,3.LF57,4.LF63,5.LF67,
6.LF71,7.LF77,8.LF93,9.LF94,10.LF99



1.LF101,2.LF103,3.LF108,4.LF119,5
.LF155,6.LF159,7.LF164,8.LF167,9.
LF181,10.LF183



1.LF184,2.LF185,3.LF188,4.LF192,5
.LF240,6.LF275,7.LF290,8.LP167,9.
LP181,10.LP183



1.LP101,2.LP103,3.LP108,4.LP119,
5.LP155,6.LP159,7.LP164,8.CB99,9.
CB181,10.CB290