



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

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Cuantificación de miRNAs relacionados al sistema
inmune en leche materna y leche de fórmula”**

TESIS

Que presenta:

Biol. Arlene Aguilera Hernández

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 2020

Comité tutorial

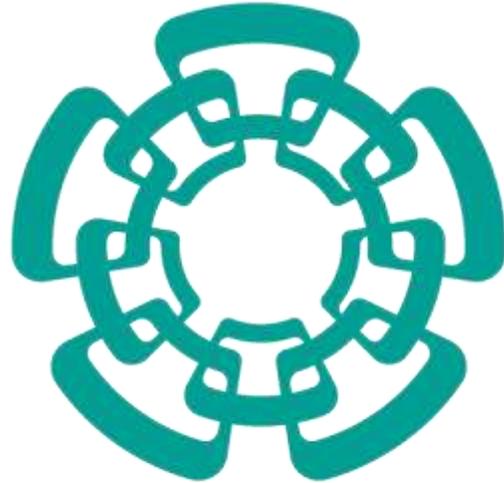
ASESORES

Dr. Bulmaro Cisneros Vega
Departamento de Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

ASESOR EXTERNO AL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Dr. Carlos Hoyo Vadillo
Departamento de Farmacología
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

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.



Cinvestav

Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo, Biol. Carolina Miranda Brito, por su asistencia técnica en el laboratorio y al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con reactivos y material del laboratorio y a Viridiana Rosas Ocegueda por su apoyo administrativo.

Este trabajo fue financiado con apoyo del Cinvestav-IPN y del Fondo SEP-Cinvestav-2018-174.

Durante el desarrollo de este trabajo Arlene Aguilera Hernández (CVU: 911623) fue becaria de maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante el período de Septiembre del año 2018 a Agosto del año 2020.

Agradecimientos académicos

“Si he llegado a ver más lejos que otros es porque me subí a hombros de gigantes”. Isaac Newton (1643-1727).

En primera instancia me gustaría agradecer al Dr. Jaime García Mena por dejarme integrar en su laboratorio y a su equipo de trabajo, por ser un jefe dedicado a sus alumnos, por brindarme su asesoría y apoyo en la realización de este proyecto.

Al Dr. Hoyo agradezco por permitirme quedar en su laboratorio, por aceptarme como una de sus alumnas y ser mi asesor de tesis.

Al Dr. Bulmaro Cisneros agradezco por sus consejos en la realización de esta tesis y apoyo como parte del comité tutorial.

Muchas gracias a Carolina Miranda Brito por introducirme en las técnicas de biología molecular, por las pláticas y el apoyo en el desarrollo de este trabajo. A Alberto por sus aportaciones en los experimentos, sus consejos y apoyo con el material del laboratorio

A Flor del laboratorio de Farmacología, muchísimas gracias por todo el apoyo en el laboratorio y las pláticas con las chicas, hicieron que fuera muy agradable cada día en el laboratorio.

A todos los maestros de Cinvestav agradezco por exigirme y formarme como una maestra en la especialidad de genética y biología molecular

A Viridiana por ayudarme a comprar todos esos reactivos y a la secretaria Gaby por su excelente trabajo en los tramites y apoyo administrativo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme la beca de maestría (CVU: 911623) durante el periodo de Septiembre 2018-Agosto 2020.

Agradecimientos personales

Me gustaría agradecerles a mis padres por apoyarme en cada proyecto de mi vida, siempre han estado para mí, apoyándome y cuidando que nada me falte, gracias por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, este logro también es de ustedes.

Le agradezco a mi novio Diego Ivar, por alentarme a conseguir todo lo que me propongo, por ser mi apoyo cuando ya no quiero continuar, por ayudarme a ver siempre las cosas buenas de la vida, en verdad te admiro mucho, haces mi mundo más bonito.

A mis amigos de la maestría, gracias por los miércoles de seminario y distraerme un poco del estrés de la tesis. Alejandra, no solo fuiste mi mejor amiga en la maestría sino la mejor roomie, gracias por invitarme a vivir contigo, siempre recordare las cenas de ramen y palomitas. A Lawrence, gracias por ser mi primer amigo en la maestría, por animarme a salir a conocer la CDMX, por las pláticas y consejos. A Daniel gracias por esas salidas tan divertidas al sushi, las alitas, a los taquitos. Gracias a ustedes 3 aumente más de 3 kilos.

A toda mi generación de la maestría les agradezco por ser buenos amigos y compañeros, a Jairo, Charly, Irving, Karla, Ángeles, Dany, Víctor, Meny gracias por las fiestas y las risas que pasamos, les deseo mucho éxito.

A mis compañeros de laboratorio de Genética, gracias por ser mis pokeamigos, cada día fue muy divertido en el laboratorio. Cintia, eres una gran amiga, gracias por las pláticas y consejos. Fernandote, Loan, Juan Carlos, gracias por las comidas, los maratones de series, las incursiones. Doniel (Daniel), Kary, Tamara gracias por su amistad. Marcos gracias por enseñarme muchas técnicas en el Laboratorio y gracias a Meny mi compañero de generación por el apoyo en el laboratorio

Agradezco a mis compañeras de Farmacología por tantos buenos momentos en el laboratorio. A Karina gracias por tu amistad y por instruirme en el estudio de la leche materna. A Alejandra y Tania gracias por las anécdotas, las canciones, las películas, ustedes le dan vida al laboratorio de Farmacología.

Índice

Índice de Figuras.....	7
Índice de Tablas	8
Abreviaturas	8
Resumen.....	9
Abstract	10
I. Introducción.....	11
Leche materna y sus beneficios	11
Componentes de la leche materna y fórmula láctea	14
miRNAs.....	17
II. Antecedentes.....	19
III. Justificación.....	22
IV. Pregunta científica.....	22
V. Hipótesis.....	22
VI. Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
VII. Alcance	23
VIII. Diseño experimental	24
IX. Cronograma.....	25
X. Metodología	26
Selección de muestras	26
Selección de miRNAs inmunoregulatorios	27
Extracción total de RNA	27
Calidad del RNA	28
Transcripción reversa.....	30
PCR de punto final.....	32
XI. Resultados	39
XII. Discusión	55
XIII. Conclusión.....	60
XIV. Bibliografía.....	60
XV. Anexos.....	68

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de la glándula mamaria.....	11
Figura 2. Comparación de la lactancia materna en menores de 2 años entre los años 2012 y 2018.....	13
Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología a utilizar en este proyecto.....	24
Figura 4. Típico fraccionamiento por centrifugación de leche materna.....	28
Figura 5. Los primers en Stem loop permiten amplificar los miRNAs maduros al aumentar la longitud de la cadena.....	31
Figura 6. Vector de clonación pJET1.2.....	33
Figura 7. Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% con los amplicones de PCR de punto final de cada uno de los miRNAs seleccionados.....	44
Figura 8. Gel de agarosa al 1% con los plásmidos ligados extraídos por lisis alcalina.....	46
Figura 9. Gel de agarosa al 4% de bajo punto de fusión con los productos de PCR de cada una de las clonas con los miRNAs seleccionados.....	47
Figura 10. Gel de agarosa al 4% de bajo punto de fusión con los productos de PCR de cada una de las clonas con los miRNAs seleccionados.....	48
Figura 11. Plásmido recombinante de pJET1.2+miR148.....	49
Figura 12. Plásmido recombinante de pJET1.2+ miR181.....	50
Figura 13. Plásmido recombinante de pJET1.2+miR146.....	51
Figura 14. Plásmido recombinante de pJET1.2+miR200.....	52
Figura 15. Plásmido recombinante de pJET1.2+miR155.....	53
Figura 16. Regresión lineal de la curva estándar, Ct's versus el logaritmo de la cantidad de miRNA cel-39 (resultados esperados).	54
Figura 17. Cuantificación relativa de los miRNAs en la leche humana y formula láctea. LM: Leche materna. FL: Formula Lactea (resultados esperados).....	55

Índice de Tablas

Tabla 1. Diferencias en la composición de la leche humana y leche de vaca....	14
Tabla 2. Protocolo de transcripción reversa	32
Tabla 3. Condiciones para la amplificación	32
Tabla 4. Condiciones de secuenciación	36
Tabla 5. Condiciones para la amplificación	38
Tabla 6. Características sociodemográficas de la población estudiada	39
Tabla 7. Características clínicas de la población estudiada	40
Tabla 8. miRNAs inmunorregulatorios seleccionados	41
Tabla 9. Secuencias de los oligonucleótidos para cuantificación de miRNAs por RT-qPCR	42
Tabla 10. Temperatura de fusión de los oligonucleótidos para la cuantificación de miRNAs por RT-qPCR.....	43
Tabla 11. Número de colonias obtenidas de la transformación de <i>E. coli</i> DH5 α (recA).....	45

Abreviaturas

miRNAs: microRNAs

OMS: Organización mundial de la salud

UNICEF: Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia

VE: Vesículas extracelulares

RT: Transcripción reversa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

E. coli: *Escherichia coli*

LB agar: Luria-Bertani agar

TBE: Tris Borato EDTA

RT: Transcripción reversa

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

Resumen

La leche materna tiene una composición única que ha evolucionado durante millones de años para satisfacer las necesidades nutrimentales de los infantes, además contiene factores bioactivos importantes para el desarrollo infantil que han demostrado proporcionar beneficios a la salud a corto y largo plazo. Entre estos factores destacan los miRNAs, moléculas pequeñas de 19-24 nucleótidos que actúan como reguladores genéticos al inhibir la traducción de proteínas o inducir la degradación del RNA. Sin embargo, no siempre es posible proporcionar una alimentación exclusiva con leche materna por lo que se desarrollaron alternativas como la formula láctea. Aunque esta imita la composición de la leche materna carece de algunos factores bioactivos importantes.

Varios autores han aislado miRNAs en la leche materna, encontrando más de 1400 miRNAs maduros, estos son muy estables de manera que se han encontrado en la formula láctea. Algunos miRNAs están involucrados en varias redes de señalización relacionadas con el sistema inmunológico y dado a que los miRNAs pueden variar por la historia genética de una población, es importante conocer si la leche materna y formula láctea presentan la misma concentración en 5 miRNAs inmunorreguladores.

Basándonos en la literatura se seleccionaron los miRNAs miR-148 a-3p, miR-181 a-5p, miR-146 b-5p, miR-200 a-3p y miR-155-5p por encontrarse en alta concentración en la leche y por su papel en la inmunidad innata y adquirida. Para identificar estos miRNAs en la leche se siguió una metodología de RT-PCR con primers en stem-loop que permiten su amplificación y posterior cuantificación por PCR en tiempo real.

Se encontró que los 5 miRNAs se encuentran presentes en la leche materna, para comprobar que se amplificó el miRNA de interés y no otra secuencia, se secuenciaron en el plásmido pJET1.2/blunt, corroborando que la secuencia amplificada corresponde a los miRNAs seleccionados.

Abstract

Breast milk has a unique composition that has evolved over millions of years to satisfy the nutritional needs of infants. It also contains important bioactive factors for infant development that have provided short and long-term health benefits. Among these factors, miRNAs, small molecules of 19-24 nucleotides that act as genetic regulators, inhibiting protein translation or inducing RNA degradation. However, it isn't always possible to provide an exclusive diet with breast milk, so alternatives such as milk formula were developed. Although this mimic the composition of breast milk lacks some important bioactive factors.

Several authors have isolated miRNAs in breast milk, finding more than 1400 mature miRNAs, these are very stable so that they have been found in the milk formula. Some miRNAs are involved in several signaling networks related to the immune system and because the miRNAs may vary depending on the genetic history of a population, it is important to know if breast milk and milk formula would have the same concentration on 5 immunoregulatory miRNAs.

Based on the literature, miRNAs miR-148 a-3p, miR-181 a-5p, miR-146 b-5p, miR-200 a-3p and miR-155-5p were selected for being in high concentration in milk and for its role in innate and acquired immunity. To identify these miRNAs in milk, we look for a RT-PCR methodology with stem-loop primers that allows their amplification and subsequent quantification by real-time PCR.

The 5 miRNAs were found to be present in breast milk, in order to search for the miRNA of interest and not another sequence to be amplified, they were sequenced in the plasmid pJET1.2/blunt, corroborating that the amplified sequence corresponds to the selected miRNAs.

I. Introducción

Leche materna y sus beneficios

La leche materna es una secreción compleja producida en las glándulas mamarias, la cual se ha considerado la principal fuente de nutrición, protección inmunológica y programación para el desarrollo del infante (Alsaweed *et al.*, 2015; Hassiotou *et al.*, 2013). La glándula mamaria es una estructura túbulo alveolar compuesta por células epiteliales que recubren los alvéolos mamarios (Figura 1); donde mediante una secreción merocrina/apocrina la leche se forma y se almacena en la luz alveolar adyacente a estas células. Durante la eyección, la leche es expulsada de los alvéolos por la contracción de las células mioepiteliales circundantes y fluye de los conductos hacia el canal del pezón desde el cual puede extraerse mediante succión u ordeño (Neville *et al.*, 1983; Rezaei *et al.*, 2016).

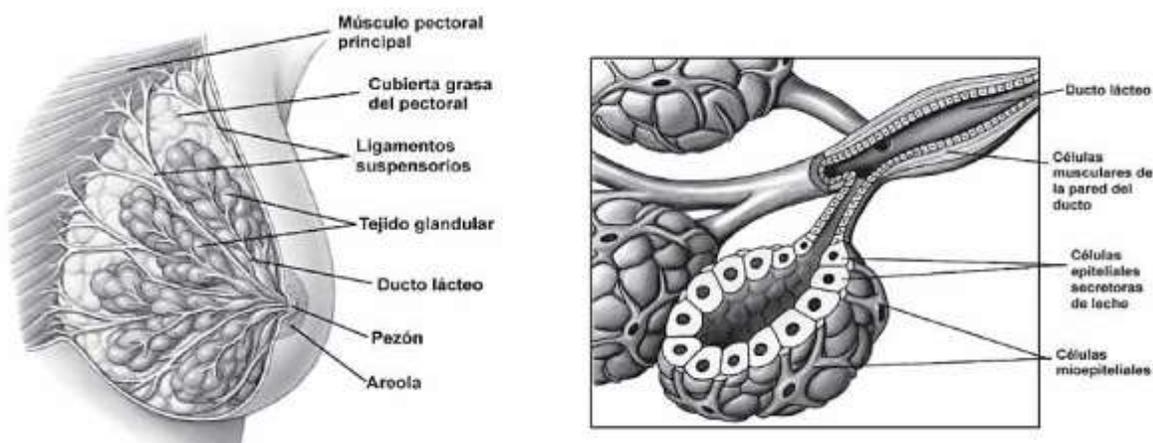


Figura 1. Estructura de la glándula mamaria. Las células mamarias epiteliales son las responsables de la síntesis y liberación de la leche. Este fluido viaja por los ductos hasta llegar al pezón (Extraído de Pareja E., (2018).

La leche de cada especie tiene una composición única que ha evolucionado durante millones de años para satisfacer las necesidades de las crías de esa especie (Witkowska-Zimny & Kaminska-El-Hassan, 2017). Asimismo, desde el punto de vista nutricional, la infancia es un período vulnerable, ya que es el único

período en que un alimento es la única fuente de nutrición, y justamente durante una etapa de maduración y desarrollo de los órganos (Picciano M. F., 2001).

Debido a la importancia de la leche materna en el crecimiento, desarrollo y salud que ofrecen a los infantes, la OMS y UNICEF recomiendan a todas las madres que proporcionen la lactancia materna exclusiva durante los primeros 6 meses de vida. Este tipo de alimentación consiste en la administración única de leche materna, sin ningún otro alimento ni bebida (tampoco agua). Se permite que el lactante reciba sales de rehidratación oral, gotas, jarabes de vitaminas, minerales o medicinas. También recomiendan que la lactancia materna: a) Se inicie en la primera hora de vida; b) Se haga a libre demanda (con la frecuencia que quiera el niño, tanto de día como de noche), c) Evitar el uso de sucedáneos de leche materna (biberones, tetinas ni chupones), d) Los lactantes deben seguir con la lactancia materna, hasta los 24 meses de edad o más, si la madre y el niño así lo desean, complementando con otros alimentos nutritivos (INEGI, 2018; OMS & UNICEF, 2003).

A partir de los 6 meses, la recomendación de la OMS es que se introduzcan alimentos y líquidos complementarios, continuando con la lactancia (OMS & UNICEF, 2003). La evidencia científica señala que a partir de esta edad, la leche materna deja de cubrir parte de los requerimientos nutricionales del infante, por lo que es necesaria la introducción de alimentos densos adecuados para la edad (Dewey & Brown, 2003).

Es ampliamente reconocido que los infantes alimentados con leche materna mostraron sistemas inmunes más fuertes y una mayor resistencia a enfermedades infecciosas, así como tasas más bajas de enfermedades crónicas en comparación con los lactantes alimentados con fórmula láctea (Aly *et al.*, 2018; Eidelman & Schanler, 2012). Se observó un menor riesgo de infección gastrointestinal, otitis media, meningitis, alergias, infección del tracto respiratorio, cáncer, diabetes tipo 1 y síndrome de muerte súbita del lactante (Golan-Gerstl *et al.*, 2017; Munch *et al.*, 2013). Además, la lactancia materna exclusiva durante 3 a 4 meses puede proteger contra la obesidad infantil, así como reducir la incidencia de asma, dermatitis atópica y eccema y estos beneficios pueden

persistir hasta la edad adulta. Esto sugiere que la lactancia materna también tiene consecuencias duraderas a través de su influencia temprana en el sistema inmune en desarrollo (Aly *et al.*, 2018; Eidelman & Schanler, 2012; Simpson *et al.*, 2015).

Con base en lo anterior, la lactancia materna debe recomendarse activamente y apoyarse como el método preferido de alimentación infantil. Se ha documentado que en México ha aumentado el número de mujeres que amamantan durante 6 meses con leche materna exclusivamente. De acuerdo con resultados publicados en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 (ENSANUT), el porcentaje nacional de lactancia materna exclusiva en menores de seis meses se duplicó en un periodo comprendido entre el 2012 con 14.4% a 28.6 % en el 2018 (Figura 2). Aunque esto representa un importante avance, no es suficiente para cumplir con el derecho de todos los niños y niñas a una buena nutrición desde su nacimiento, ya que menos del 50% de los niños reciben este valioso alimento (UNICEF, 2018). Sin embargo, la decisión de amamantar es muy personal y a menudo está influenciada por muchos factores. En ciertas situaciones, la lactancia materna puede no ser posible, ser insuficiente o ser inadecuada, teniéndose que garantizar la nutrición del infante con otras alternativas como las fórmula lácteas (Martin *et al.*, 2016).

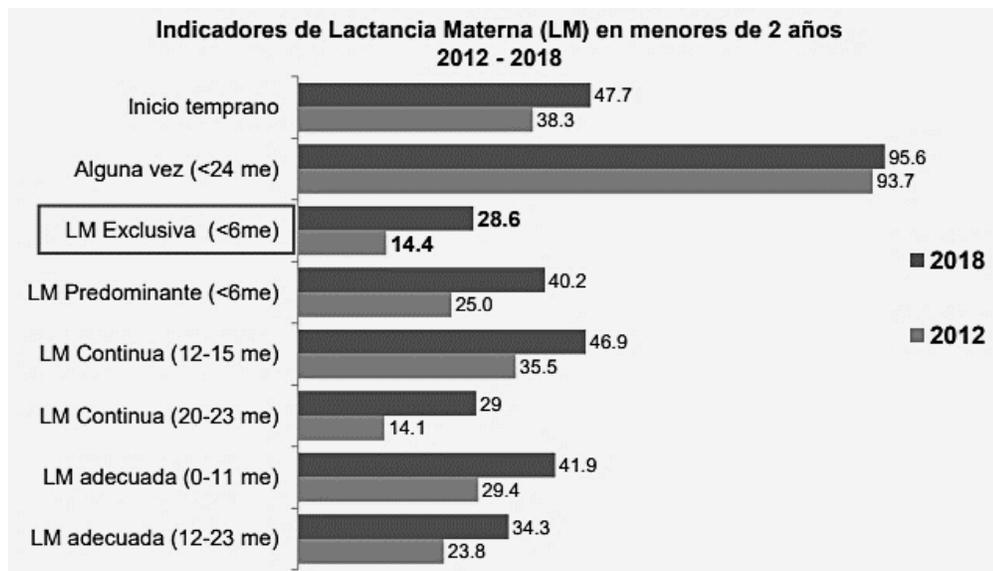


Figura 2. Comparación de la lactancia materna en menores de 2 años entre los años 2012 y 2018. (me=meses). Extraído de ENSANUT (2018).

Componentes de la leche materna y fórmula láctea

La leche materna es especialmente adecuada para el lactante, tanto en su composición nutricional como en los factores bioactivos no nutritivos que promueven la supervivencia y el desarrollo saludable (Rani *et al.*, 2017). Los componentes nutricionales provienen de tres fuentes: algunos de los nutrientes se originan por síntesis en el lactocito, algunos son de origen dietético y otros se originan de las reservas maternas (Ballard & Morrow, 2013).

La leche materna tiene una fina composición de macro y micronutrientes. Dentro de los macronutrientes se incluyen las proteínas, la grasa, la lactosa, y los oligosacáridos, mientras que los micronutrientes incluyen vitaminas y minerales con el buen equilibrio de ambos (Rani *et al.*, 2017). Durante años, las compañías de fórmulas lácteas han luchado por replicar el equilibrio de lípidos, oligosacáridos y proteínas de la leche materna que son necesarios para la nutrición infantil. Se usan comúnmente la leche de vaca o la leche de soja como base para las fórmulas lácteas, con ingredientes suplementarios agregados para asemejarse a la composición de la leche materna. Entre ellos añaden hierro, nucleótidos, ácidos grasos como ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico, entre otros (Martin *et al.*, 2016).

La composición media de macronutrientes de la leche humana madura difiere con la composición de la leche de vaca como se observa en la Tabla 1. La concentración de proteínas y grasas es mayor en la leche de vaca, sin embargo, la leche de vaca tiene valores muy bajos en la concentración de lactosa y oligosacáridos (Ballard & Morrow, 2013).

Tabla 1. Diferencias en la composición de la leche humana y leche de vaca

Componentes	Leche humana	Leche de vaca
Proteína (g/dL)	0.9 a 1.2	3.3
Grasa (g/dL)	3.2 a 3.6	3.7
Lactosa (g/dL)	6.7 a 7.8	4.5
Oligosacáridos (g/dL)	0.7 a 1.2	0.1

Modificado de Figueroa-Lozano & de Vos (2019).

Entre los micronutrientes, la leche materna humana contiene cantidades adecuadas de la mayoría de las vitaminas para apoyar el crecimiento normal del bebé, a excepción de las vitaminas D y K. En comparación con la leche bovina, la leche humana contiene más vitamina A, E, C e inositol. Sin embargo, tiene un contenido más bajo de vitaminas B1, B2, B6, B12, K, biotina, ácido pantoténico y colina (Guo M., 2014).

El sodio, el potasio, el cloruro, el calcio, el magnesio, el fósforo y el sulfato son los principales minerales que se encuentran en la leche humana. Sin embargo, los contenidos de minerales son comparables entre la leche humana y la leche bovina. El determinante principal en la concentración mineral en la leche humana es la duración de la lactancia. Ya que se ha observado que a medida que avanza la lactancia, las concentraciones de sodio y cloruro disminuyen mientras que aumentan los niveles de potasio, calcio, magnesio y fosfato libre (Guo M., 2014; Martin *et al.*, 2016).

Las estimaciones de energía en la leche humana oscilan entre 65 y 70 kcal/dL y están altamente correlacionadas con el contenido de grasa, mientras que, la fórmula láctea preparada lista para el consumo contiene no menos de 60 kcal (250 kJ) y no más de 70 kcal (295 kJ) de energía por 100 ml (Ballard & Morrow, 2013; Martin *et al.*, 2016).

Además, la leche materna ha demostrado generar beneficios a corto y largo plazo debido a varios componentes funcionales o bioactivos. Algunos de estos componentes funcionales son oligosacáridos, ácidos grasos poliinsaturados, nucleótidos, péptidos, vesículas extracelulares, entre otros, los cuales son transferidos a los infantes a través del amamantamiento (Aly *et al.*, 2018; Gomez-Gallego *et al.*, 2016; Karlsson *et al.*, 2016; Walker A., 2010).

Así mismo, la leche materna confiere inmunidad activa y pasiva al lactante porque es una rica fuente de inmunoglobulinas, lactoferrina, lisozimas, citocinas y muchos otros factores inmunológicos (Witkowska-Zimny & Kaminska-El-Hassan, 2017). La IgA secretora (sIgA), es la principal inmunoglobulina de la leche humana, confiere inmunidad materna adquirida al lactante. Mientras que los anticuerpos

IgG e IgM también están presentes en la leche humana, pero en concentraciones mucho más bajas (Hassiotou *et al.*, 2013).

La leche materna contiene varios tipos celulares, entre ellas están incluidas: las células epiteliales maduras, las células progenitoras, las células madre y los leucocitos. Mientras que algunas son endógenas a la glándula mamaria, otras (por ejemplo, los leucocitos) migran a este sitio desde los vasos linfáticos y la circulación sistémica (Hassiotou *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que la leche materna es una fuente continua de bacterias comensales, mutualistas y probióticas para el intestino del lactante (Collado *et al.*, 2009). En una población Mexicana se encontró una alta frecuencia de los Phylas Proteobacteria y Firmicutes (52 y 32% respectivamente) y taxones microbianos como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Propionibacterium* y Bifidobacteriaceae (Corona-Cervantes *et al.*, 2020). Estas bacterias pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de la microbiota intestinal del lactante (Collado *et al.*, 2009). Por el contrario, la alimentación con fórmulas lácteas ya sea exclusiva o parcial, altera la microbiota intestinal, aumenta los taxones bacterianos proinflamatorios, aumenta la permeabilidad intestinal y da como resultado concentraciones más bajas de ácidos grasos de cadena corta en comparación con infantes alimentados mediante lactancia materna exclusiva (Bäckhed *et al.*, 2015; O'Sullivan *et al.*, 2015; Siigur *et al.*, 1993).

En los últimos años se ha incrementado la atención a las vesículas extracelulares contenidas en la leche materna (VE) por su importancia en distintos procesos celulares; estas se clasifican generalmente en exosomas y micro vesículas, que tienen distintas vías de biogénesis y pueden diferir en tamaño y carga (van der Grein & Hoen, 2014; van Niel *et al.*, 2018). Las VE son pequeñas vesículas de membrana bilipídica que se liberan en el entorno extracelular desde una variedad de células, lo que permite la comunicación célula-célula a través de la interacción específica con las células receptoras (Karlsson *et al.*, 2016; Mathivanan *et al.*, 2010). Estos pueden contener cantidades notables de microRNAs (miRNAs), otros RNAs pequeños no codificantes y RNAs mensajeros (mRNAs) (Mathivanan *et al.*, 2010; Valadi *et al.*, 2007).

miRNAs

Los miRNAs fueron estudiados por primera vez en 1993 en *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993), fueron considerados como reguladores cruciales de la expresión genética a un nivel postranscripcional al unirse al RNA mensajero (mRNA) para inhibir la traducción de proteínas y/o inducir la degradación del RNA (Alsaweed *et al.*, 2015). Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes (19-24 nucleótidos) los cuales silencian genes mediante la desestabilización de secuencias complementarias de mRNA, previniendo la traducción de mRNAs (Djuranovic *et al.*, 2012), o inhibiendo la traducción de proteínas a través de la degradación dirigida. Cabe destacar que un solo miRNA puede unirse a múltiples mRNAs incrementando exponencialmente su actividad reguladora (Tomé-Carneiro *et al.*, 2018).

En una gran proporción los microARNs son generados a partir de un transcripto primario largo, en un proceso secuencial de dos reacciones las cuales son guiadas por Drosha y Dicer, en la llamada vía canónica de generación de microARNs. Sin embargo, actualmente han sido descritos microARNs generados por vías alternas llamadas vías no canónicas (Pablón-Martínez V., 2011).

Tradicionalmente, los miRNAs se han considerado reguladores genéticos endógenos. Sin embargo, en los últimos años, se han descubierto RNA circulantes exógenos en el torrente sanguíneo, lo que sugiere que también pueden ser absorbidos por células receptoras y ejercer funciones específicas en el órgano receptor (Tomé-Carneiro *et al.*, 2018). Los miRNAs extracelulares secretados ahora se consideran una forma importante de comunicación intercelular además de la unión celular, la adhesión, la autocrina, la paracrina y la endocrina (Chen *et al.*, 2012).

Varios estudios han demostrado que los miRNAs en la leche son estables en diversas condiciones extremas *in vitro*. Por ejemplo, los miRNAs se mantuvieron estables en condiciones muy ácidas (pH 1.0), es resistente a los tratamientos agresivos como temperaturas altas, ciclos de congelación y descongelación. A pesar de la presencia de actividad de RNasa en la leche, los

miRNAs están presentes de forma estable, debido a que se encuentran contenidos en vesículas extracelulares con una bicapa lipídica que actúa como cubierta protectora; mientras que en experimentos se ha demostrado que los miRNAs exógenos agregados a la leche se degradan por estos tratamientos (Kosaka *et al.*, 2010; Rani *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2011). Esto sugiere que estas moléculas pueden tolerar el ambiente gastrointestinal del infante y pueden ser absorbidos en el intestino, influyendo así en el sistema inmunológico, ya que el intestino es uno de sus principales órganos inmunitarios (Kosaka *et al.*, 2010).

Los miRNAs podrían atravesar el intestino por diferentes vías: a) En la vía transcelular, los RNA exógenos ingresan a las células a través del lado apical, cruzan el citoplasma y salen por el lado basolateral, enfrentando varias barreras intracelulares, B) La ruta de transcitosis es un transporte activo (es decir, mediado por un receptor específico) por el cual las vesículas son guiadas por la célula a través de los transportadores en un lado de la membrana y se liberan en el otro lado; c) la última vía es a través de las células inmunes presentes en la barrera intestinal, que pueden atrapar los ácidos nucleicos y otras moléculas en un lado y liberarlos en el otro, con o sin movimiento de la célula a una nueva ubicación (Tomé-Carneiro *et al.*, 2018; Witwer & Hirschi, 2014).

Además, se debe considerar que el intestino de los recién nacidos se comporta de manera diferente al intestino maduro, en un estado inmaduro este presenta una mayor permeabilidad paracelular, permitiendo una mayor transcitosis de las macromoléculas. Se ha observado que las macromoléculas se transfieren intactas a través de las células absorbentes del intestino del infante durante el periodo neonatal (Fujita *et al.*, 2007). Asimismo, la transferencia de miRNAs a través de las células epiteliales intestinales se facilita si están contenidas en estructuras como los exosomas, los glóbulos de grasa o incluso en las células de la leche (Alsaweed *et al.*, 2015). Se ha demostrado que el RNA de las micro vesículas de la leche materna es integrado en otras células, por lo que los exosomas en la leche materna pueden ser un vector importante para la comunicación entre la madre y el niño a través de la lactancia materna (Lässer *et al.*, 2011).

II. Antecedentes

En el 2010, Weber y colaboradores aislaron y caracterizaron miRNAs de 12 diferentes fluidos humanos incluyendo calostro humano y leche, encontraron que la saliva, la leche materna y el líquido seminal tuvieron un mayor número de especies de miRNAs detectables, reportando 429 miRNAs de los 714 en la fracción acuosa de leche materna (Weber *et al.*, 2010).

Posteriormente Kosaka *et al.*, (2010) estudiaron la expresión de miRNAs en la leche mediante análisis de microarreglos y descubrieron un gran número de miRNAs (281 de los 723 miRNAs humanos conocidos en ese momento). Otros estudios se han hecho mediante secuenciación masiva de los exosomas de la leche materna, Zhou *et al.*, (2011) reveló 602 miRNAs únicos, que están en un rango de tamaño estrecho (20-24 nucleótidos), y que muchos de ellos están involucrados en la función inmunológica. Mientras que en estudios más recientes se reportaron 1,467 miRNAs maduros, destacando la importancia de la leche como un fluido bioactivo que podría regular el desarrollo del infante (Alsaweed *et al.*, 2016a)

Muchos miRNAs se han caracterizado por estar involucrados en varias redes de señalización relacionadas con el sistema inmunológico; hasta ahora, se han descrito 59 miRNAs inmuno-relacionados en exosomas de leche humana (Kosaka *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011). Sin embargo, la expresión de los miRNAs es variable a través de las diferentes etapas de la lactancia; se ha reportado que las vesículas en el calostro están enriquecidas de miRNAs relacionados con el sistema inmunitario, mientras que las vesículas de la leche madura tienen una menor abundancia de estos miRNAs (Sun *et al.*, 2013). De la misma manera se ha visto que los primeros 6 meses de lactancia materna son esenciales ya que durante este periodo la leche contiene una mayor expresión de los miRNAs relacionados con el sistema inmunitario, en particular, Kosaka *et al.*, (2010) observaron que los niveles de los miRNAs relacionados con el sistema inmunitario: miR-181a, miR-155, miR-17 y miR-92; se encontraban en una mayor proporción en los primeros 6 meses de lactancia.

Se ha visto que una serie de características maternas influyen en la composición nutricional de la leche materna, entre ellos, el parto prematuro, la etapa de lactancia, la paridad, el índice de masa corporal (IMC) materno y el estado de salud de la madre y el infante (Alsaweed *et al.*, 2015). De la misma manera, Xi *et al.*, (2016), analizaron si las características maternas afectaban la expresión de los miRNAs en calostro, encontrando que la edad materna y las semanas de gestación no afectaban la expresión de los miRNAs, sin embargo factores como el peso materno y la etapa de lactancia si modificaban la expresión de los miRNAs estudiados.

En otro estudio se caracterizó el perfil de miRNAs en leche materna recolectada antes y después de la alimentación del infante, encontrando que las 19 especies de miRNAs con mayor expresión fueron idénticas en la leche antes de la alimentación y en la leche posterior a la alimentación y representaron el 86,2% del total de miRNAs en todas las muestras (Alsaweed *et al.*, 2016a).

Además, los miRNAs podrían estar conservados evolutivamente debido a que se ha observado que se comparten entre especies, no solo en su homología de secuencia, sino también en su incorporación en vesículas extracelulares, sugiriendo que se seleccionan evolutivamente para regular la función celular en el recién nacido. Así lo demostraron Herwijnen *et al.*, (2018), al comparar la leche de distintos mamíferos (Humano, Vaca, Cerdo, Panda), observaron que se conservaron los miRNAs let-7a, let-7b, let-7f, así como miR-148a, los cuales participan en la regulación del sistema inmunitario del recién nacido.

En este sentido, las pruebas sobre las funciones beneficiosas de los miRNAs de la leche durante la lactancia y los efectos a largo plazo serían de gran interés, especialmente en términos tecnológicos, ya que su inclusión en la leche materna tendría importantes consecuencias socioeconómicas (Tomé-Carneiro *et al.*, 2018).

Se han encontrado miRNAs en las fórmulas lácteas a base de leche bovina y a base de soya. Alsaweed *et al.*, (2016b) observaron que estas dos fórmulas contenían muy pocas especies de miRNAs maduros, y estaban presentes en niveles de expresión muy bajos en comparación con las fracciones leche humana.

La fórmula a base de leche bovina contenía 45 miRNAs maduros en comparación con 22 en la fórmula a base de soja. De los miRNAs detectados en las fórmulas, 33 eran comunes entre la fórmula a base de leche bovina y la leche humana, mientras que solo 8 miRNAs eran comunes entre la fórmula a base de soja y la leche humana.

Chen *et al.*, (2010) mostraron la presencia de grandes cantidades de miRNAs en la leche bovina e identificaron 245 miRNAs. Además, seleccionaron siete miRNAs y propusieron que se usaran como marcadores de aseguramiento de la calidad. Esos siete miRNAs son miR-26a, miR-26b, miR-200c, miR-21, miR-30d, miR-99a y miR-148a, ya que tienen una mayor expresión en todas las etapas de la lactancia (Rani *et al.*, 2017).

Sin embargo, los niveles de expresión y la función de los miRNAs pueden verse afectados por la variabilidad genética de una población. Mediante 2 mecanismos: 1) al afectar los patrones de expresión del miRNA y 2) al alterar la secuencia del RNAm blanco y así interferir con la unión (Rawlings-Goss *et al.*, 2014). Heegaard *et al.*, (2012) determinaron los perfiles de expresión de miRNAs circulantes en suero sanguíneo en pacientes con cáncer de pulmón en estadio temprano entre afroamericanos y europeos americanos. Encontrando que el perfil de miRNAs era considerablemente diferente, el miR-155 se encontraba incrementado en pacientes Afroamericanos mientras que 14 miRNAs se encontraban disminuidos en esta población en comparación con los europeos americanos.

III. Justificación

La leche materna es la principal fuente de nutrientes para los recién nacidos, se adapta en función de las necesidades de cada etapa de la vida de los lactantes, por lo que protege su salud y estimula su óptimo desarrollo físico y mental. Entre todos sus componentes, los miRNAs de la leche han ido tomando una gran importancia debido a su papel como reguladores de la expresión genética a un nivel postranscripcional, de este modo las células de la madre regulan a las células de la descendencia. Dado que los miRNAs pueden variar por la historia genética de una población, enfrentada a diferentes retos ambientales, es importante conocer si la leche de madres Mexicanas presenta los mismos miRNAs inmunorregulatorios que se han reportado en otras poblaciones y sus niveles de expresión.

En ciertas situaciones, no es posible asegurar la lactancia materna por 6 meses exclusivamente, por lo que en México se han adoptado otras alternativas para la alimentación como las fórmulas lácteas. Las cuales no tienen los mismos componentes nutricionales y bioactivos que la leche materna. En la literatura se ha reportado que las fórmulas lácteas pueden contener miRNAs, de esta manera, es importante cuantificar los miRNAs inmunorregulatorios en este sucedáneo y compararlos con la leche materna.

IV. Pregunta científica

¿Poseerá la leche materna mexicana los mismos miRNAs y la misma concentración que la fórmula láctea?

V. Hipótesis

La leche materna mexicana presenta una mayor concentración de miRNAs inmunorregulatorios en comparación a la fórmula láctea.

VI. Objetivo general

Demostrar que la leche materna mexicana presenta una mayor concentración de miRNAs inmunorregulatorios en comparación a la fórmula láctea.

Objetivos específicos

Objetivo Específico 1. Seleccionar 50 muestras del banco de leche materna de nuestro laboratorio.

Objetivo Específico 2. Seleccionar 5 miRNAs inmunoregulatorios de interés con base a su importancia en el desarrollo neonatal.

Objetivo Específico 3. Diseñar iniciadores (primers) en stem-loop útiles para la transcripción reversa y PCR en tiempo real de los miRNAs seleccionados.

Objetivo Específico 4. Cuantificar los niveles de los 5 miRNAs seleccionados en las muestras de leche materna y fórmula láctea seleccionadas.

VII. Alcance

- En el presente estudio se hará una revisión bibliográfica para identificar los miRNAs abundantes en la leche humana y que destaquen por su importancia al regular el sistema inmune.
- Se seleccionarán y estudiarán cinco (5) miRNAs inmunorregulatorios.
- Se estudiarán 50 muestra de leche de mujeres lactantes de Ecatepec adquiridas del banco de leche materna de nuestro laboratorio.
- Se estudiarán tres marcas (3) diferentes de formula láctea diseñadas para las primeras etapas del infante.
- La concentración de miRNAs se determinará por medio de PCR en tiempo real.

VIII. Diseño experimental

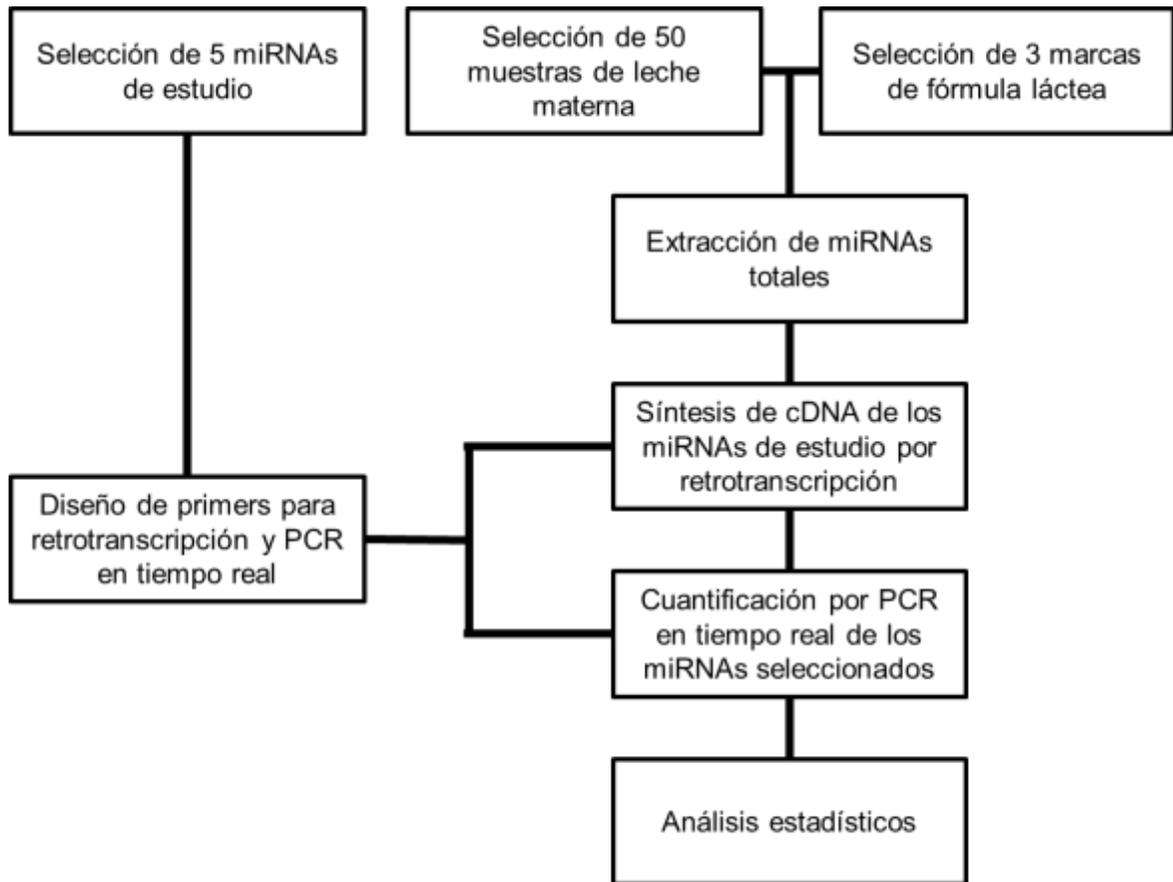


Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología a utilizar en este proyecto.

IX. Cronograma

Actividad	Mes																
	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago
Búsqueda bibliográfica																	
Diseño de primers																	
Clonación en pJET																	
Secuenciación de plásmidos																	
Extracción de miRNAs																	
PCR en tiempo real																	
Análisis estadísticos																	
Escritura de tesis																	
Correcciones de tesis																	

El color azul indica el avance, el color rojo indica el tiempo de interrupción de trabajo presencial en el Cinvestav a partir del Miércoles 18 de Marzo del año 2020.

X. Metodología

Selección de muestras

- Leche materna

Las muestras de leche se seleccionaron del Banco de Leche del Laboratorio de Referencia y apoyo para la Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav Unidad Zacatenco. Las muestras fueron adquiridas de mujeres recién paridas del Hospital General “Dr. José María Rodríguez” en Ecatepec de Morelos, Estado de México en el periodo de Noviembre de 2017 a Enero del 2018. Desde su colecta hasta la realización del proyecto las muestras se mantuvieron en congelación a -20° C para asegurar la integridad de la leche. Para ser consideradas dentro del Banco de Leche, las muestras cumplen con los siguientes:

Criterios de inclusión

- Mujeres que aceptaron voluntariamente su participación en el estudio, firmando el consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki 2013 (Apéndice 1).
- Solo se consideraron mujeres aparentemente sanas, de origen Mexicano.
- Pacientes en periodo de lactancia (0 a 8 días después del parto).

Criterios de exclusión

- Mujeres que durante más de la mitad del embarazo estuvieron bajo el tratamiento con antibióticos o bajo tratamiento hormonal.
- Mujeres que consumieron alcohol, cigarrillos o drogas a lo largo del embarazo.
- Mujeres con síndrome metabólico, obesidad o diabetes mellitus tipo 1 y 2.

- Fórmula láctea

Se buscó en la literatura y se consultó a profesionales del área cuales son las marcas de leche de fórmula láctea más usadas en las primeras etapas de lactancia

del neonato. De las cuales se seleccionaron tres tipos de fórmula láctea en polvo que tengan como base la leche bovina. Posteriormente se disolvieron en agua desionizada a 37° C de acuerdo con las instrucciones del fabricante, hasta lograr una mezcla homogénea y que corresponda con los nutrimentos diarios necesarios para el infante en las primeras etapas de vida. Las fórmulas lácteas seleccionadas fueron: ENFAMIL PREMIUM 1, GOOD CARE OPTIPRO SUPREME, NAN OPTIPRO 1.

Selección de miRNAs inmunoregulatorios

Para seleccionar los miRNAs que se utilizaron en este estudio, se consultó en la base de datos PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), donde se buscaron artículos originales y de revisión publicados entre 2000 y 2020. Se hizo una búsqueda con los términos miRNAs, leche materna, leche de fórmula, miRNAs inmunoregulatorios. Del total de trabajos consultados se eligieron 5 miRNAs que destacan por su abundancia en la leche materna al tener concentraciones altas en comparación con otros miRNAs y además están implicados en el desarrollo del sistema inmune innato y adquirido. Se obtuvieron las secuencias maduras de la base de datos miRBase 22.1 (<http://www.mirbase.org/>).

Extracción total de RNA

Con el fin de obtener los miRNAs de las muestras de leche materna y fórmula láctea primero se fraccionaron por centrifugación 1 ml de cada muestra en una centrífuga refrigerada (Eppendorf, Modelo 5415 R) durante 5 minutos a 12,000 rpm (13,500 g) en tubos de polipropileno de 1.5 mL a 20° C. Se obtuvieron 3 fracciones que incluyen las células, la capa lipídica y la fase acuosa como se muestra en la Figura 4. A partir de la fracción celular y lipídica, se obtuvo el RNA total utilizando el kit de extracción comercial mirVana™ miRNA Isolation Kit (Invitrogen™, Cat#AM1560) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

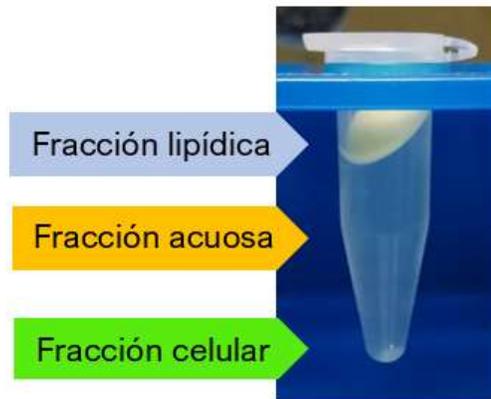


Figura 4. Típico fraccionamiento por centrifugación de leche materna. En la imagen se aprecia la fracción lipídica en la parte superior, en la parte intermedia se encuentra la fracción acuosa y la fracción celular se encuentra en la parte inferior.

La concentración de RNA que se extrae de diferentes muestras biológicas puede variar, por lo que es difícil normalizar la cantidad inicial de RNA utilizada en los estudios de expresión génica. El miRNA cel-miR-39 de *Caenorhabditis elegans* (Norgen, Cat#59000) permite normalizar la extracción de RNA y los ensayos de RT-qPCR.

El primer paso de la extracción con el kit mirVana consistió en lisar la muestra en un buffer de lisis desnaturante que estabiliza el RNA e inactiva las RNasas. Después de aplicar esta solución se añadieron 3 μL de cel-miR-39 como control interno, que está a una concentración de 33 fmol/ μL . A continuación, las muestras se someten a extracción con fenol ácido: cloroformo (2:1) que elimina la mayoría de los componentes celulares, dejando una muestra de RNA semipuro. Esto se purifica adicionalmente en una columna de filtro de fibra de vidrio para inmovilizar los RNAs pequeños y finalmente recuperarlos con la solución de elusión precalentada a 95° C. Todas las extracciones están en un volumen aproximado de 50 μL y se almacenan a -20° C.

Calidad del RNA

Con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Cat#: ND-2000) se determinó la concentración y pureza del RNA total extraído. Una relación de absorbancias A260/280 con un valor entre 2.0-2.2 se considera indicativa de un RNA de pureza óptima, mientras que valores de A260/280 >1.7, corresponden a una muestra de RNA con una pureza aceptable. Un cociente A260/280 <1.7 sería

indicativo de contaminación. Mientras que la relación de absorbancia A260/230 con un valor de 2.0 representa una pureza óptima, pero se considera que el RNA es aceptable si A260/230 es >1.5.

Usando el equipo 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent, Cat#: G2939BA) se determinó la concentración y la integridad de las muestras de RNA. Este equipo separa el RNA por electroforesis capilar y detecta las bandas mediante fluorescencia inducida por láser, así la cantidad de fluorescencia medida se correlaciona con la cantidad de RNA de un tamaño determinado.

El software de Bioanalyzer genera un electroferograma y una imagen similar a un gel donde muestra resultados como la concentración de la muestra, y la llamada relación ribosómica, a partir de la cual se puede determinar la calidad de una muestra de RNA. Conforme sucede la degradación del RNA hay una disminución en la relación de la banda ribosómica 18S a 28S y un aumento en la señal entre los dos picos ribosómicos. Así, el software Bioanalyzer con el kit RNA 6000 Pico (Agilent, Cat#: 5067-1513) genera automáticamente la relación de las subunidades ribosómicas de cada una de las muestras asignándoles un número de integridad (RIN), con un rango numérico del 1 al 10. Un valor de 10 corresponde a una muestra intacta y un valor de 1 a una muestra de RNA totalmente degradada. Un RNA se considera degradado si su RIN es < 6, muestras con un RIN entre 4 y 6 pueden ser utilizadas en experimentos de RT-PCR cuantitativa.

Diseño de oligonucleótidos para RT-PCR

Los métodos de PCR estándar requieren una molécula a copiarse que tenga al menos dos veces la longitud de cualquiera de los primers forward (sentido) o reverse (antisentido), cada uno de ellos típicamente de ~20 nt de longitud, por lo que los miRNA (17–24 nt) son cortos para acomodar un par de primers adecuados para la amplificación específica. Se utilizó un método de cuantificación de miRNAs usando primers en stem-loop que permiten alargar el cDNA objetivo y cuantificarlo por PCR en tiempo real, garantizando la especificidad con una gran sensibilidad (Chen *et al.* (2005).

Se diseñaron los oligonucleótidos en el software CLC Workbench v.8.1.3 para cada miRNA seleccionado, de acuerdo a lo recomendado por Kramer M. F. (2011):

- Los primers en stem-loop combinan 44 nt de la secuencia 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC-3' (Chen *et al.*, 2005) La especificidad de este cebador a cada miRNA es conferida por una extensión de seis nucleótidos en el extremo 3', cuya secuencia es la complementaria reversa de los últimos seis nucleótidos del extremo 3' del miRNA maduro.
- Para diseñar los primers forward se seleccionaron los primeros 12 a 17 nt del extremo 5' de la secuencia del miRNA maduro blanco y se añaden 3 a 7 nucleótidos en el extremo 5' para obtener una T_m de 60° C.
- El primer reverso universal (URP) se diseñó a partir de la misma secuencia base del stem loop (44 nt), se toman de 16 a 20 nucleótidos de la parte interna del stem loop por lo que se puede usar para cada uno de los miRNAs seleccionados.

Transcripción reversa

A partir del RNA total de cada una de las muestras se sintetizó cDNA mediante la técnica molecular de transcripción reversa (RT-PCR) usando los oligonucleótidos en "Stem-loop" (SL) diseñados previamente, que son específicos para cada uno de los miRNAs inmunorregulatorios.

Se realizó un protocolo en dos pasos, en el primer paso se realiza la transcripción reversa en el que los oligonucleótidos en SL se unen a los miRNAs permitiendo que se sintetice el cDNA. Después se cuantificará la concentración por PCR en tiempo real de cada uno de los miRNAs. Se observará un alargamiento de cadena producido por el desdoblamiento del oligo en stem-loop que permite la unión de dos primers y su detección por SybrGreen (Figura 5).

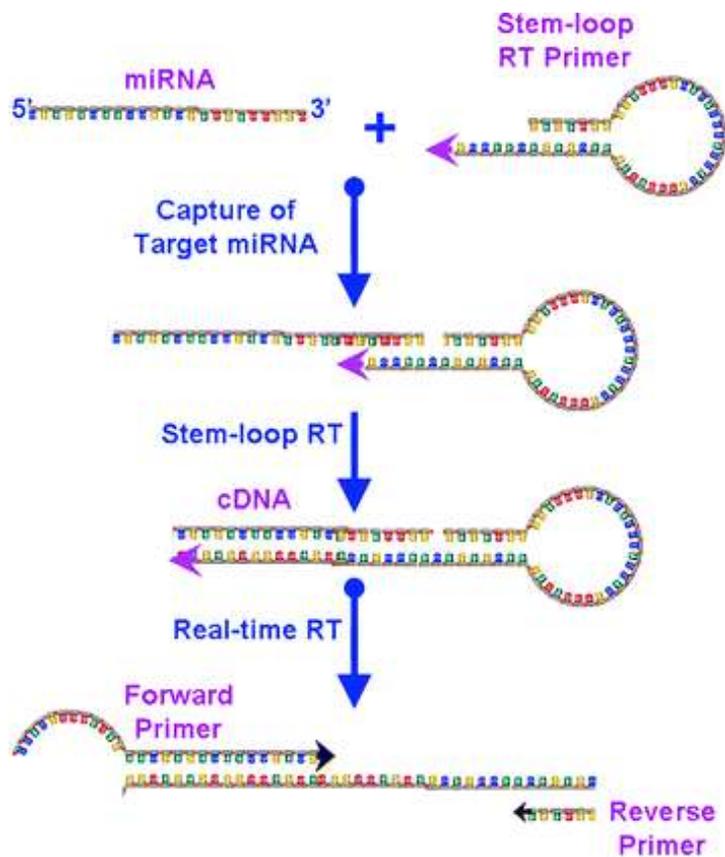


Figura 5. Los primers en Stem loop permiten amplificar los miRNAs maduros al aumentar la longitud de la cadena, por lo que permite la unión de los primers forward y reverse, y así amplificarlos por PCR. (Modificado de Wang & Yang, 2010).

Previamente a la reacción de retrotranscripción los oligos fueron tratados térmicamente (95° C por 3 min) con la intención de desnaturalizarlos y que se puedan unir a los miRNAs. Se empleo el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Cat#4366596) diseñado para sintetizar cDNA a partir de miRNAs, pequeños RNA interferentes (siRNA) y otros pequeños RNAs. Se utilizaron tubos de PCR de polipropileno libres de RNAsas a los que se agregó 1.5 µL del Buffer RT (1X), 0.19 µL del Inhibidor de RNAsa (0.25 U/µL), 0.15 µL de dNTPs (1 mM), 1 µL de la enzima MultiScribe Reverse Transcriptase (3.3 U/µL), agua libre de nucleasas, primer en stem loop específico para cada miRNAs, 2.0 µL del RNA total y H₂O-DEPC para obtener un volumen final de 15 µL. Posteriormente se colocaron los tubos en el termociclador 2700 (Applied Biosystems) siguiendo el siguiente protocolo (Tabla 2):

Tabla 2. Protocolo de transcripción reversa

Tiempo	Temperatura	Ciclos
30 min	16°C	1
30 min	42°C	1
5 min	85°C	1
∞	4° C	1

PCR de punto final

Para demostrar que la leche materna presenta los 5 miRNAs seleccionados se procedió a amplificarlos mediante PCR de punto final. A partir del cDNA de cada una de las muestras se realizó una reacción por cada uno de los miRNAs utilizando los primers forward (sentido) y el primer URP (antisentido) diseñados previamente. La amplificación se realizó en tubos de PCR de polipropileno, a los que se agregaron 5 µL de Buffer (1X), 4 µL de MgCl₂ (2mM), 1µL de dNTPS (0.2 mM), primers forward y URP, 0.25 µL de Taq Pol (0.025mM), 2 µL cDNA de cada una de las muestras, y H₂O-DEPC para obtener un volumen de 50µL. Los tubos se colocaron en el termociclador 2700 (Applied Biosystems) de acuerdo con el siguiente protocolo:

Tabla 3. Condiciones para la amplificación

Tiempo	Temperatura	Ciclos
10 min	95°C	1
15 seg	95°C	35
15 seg	60°C	
15 seg	72°C	
10 min	72°C	1
∞	4°C	1

Para verificar la calidad y el tamaño del producto amplificado se fraccionaron por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% teñido con Midori Green. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular GeneRuler Low range (Thermo Scientific, Cat# SM1193) de 25pb a 700 pb para comprobar la presencia de los amplicones esperados de 70 nt. La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

Clonación en el vector pJET1.2/blunt.

Se clonaron los productos de PCR de la retrotranscripción en el vector de clonación pJET1.2/blunt (Thermo Scientific™, Cat#: K1231) para comprobar que los primers no se estén uniendo a otros blancos en la célula y la secuencia de los miRNAs sea correcta así como la secuencia de los primers en stem loop. El vector contiene un gen que codifica para una enzima de restricción letal que se interrumpe cuando se liga un inserto de DNA en el sitio de clonación (Figura 5). Como resultado, solo células bacterianas con plásmidos recombinantes pueden formar colonias, además que el vector le confiere resistencia a ampicilina. Las moléculas recircularizadas de pJET1.2 que carecen de inserto expresan la enzima de restricción letal, que mata la célula huésped de *E. coli* después de la transformación.

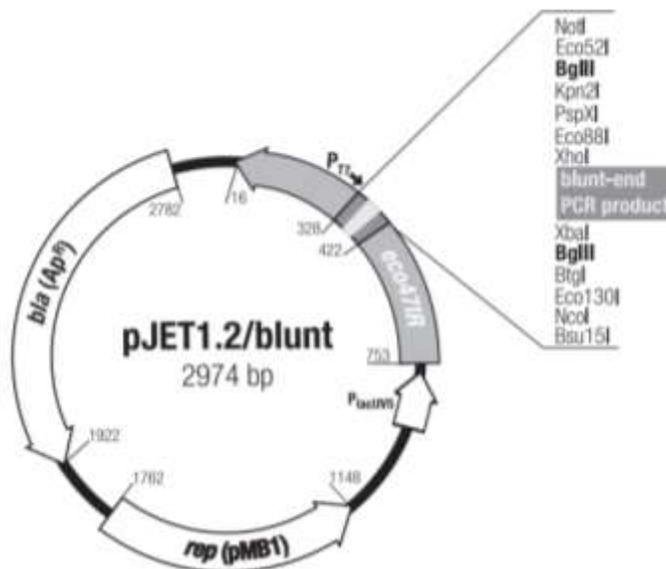


Figura 6. Vector de clonación pJET1.2. El vector contiene un gen que codifica para la enzima de restricción letal (*eco47IR*) que se interrumpe cuando se liga un inserto de DNA en el sitio de clonación Blunt-end.

La clonación se puede dividir en dos fases:

Reacción de blunting: se colocó 10uL de Buffer 2X, 1uL de producto de PCR, 6uL de agua libre de nucleasas y 1 uL de la enzima exonucleasa DNA blunting, la cual va a cortar los extremos de los fragmentos de DNA dejando extremos romos, se

agitó y centrifugo por 5 segundos y se incubo la mezcla a 70° C durante 5 minutos, dejando los productos de PCR listos para la siguiente fase.

Reacción de ligación: a la mezcla anterior se le agregó 1 uL del vector de clonación pJET1.2/blunt y 1 uL de la ligasa T4 DNA, la cual se incubó a 22° C durante 5 min y se prosiguió a la transformación.

Preparación de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α (*recA*) competentes para transformación con CaCl₂.

Para transformar las bacterias con el vector de clonación las células tienen que estar competentes, esto se logró creciendo *Escherichia coli* (*E.coli*) DH5α (*recA*) en placa de medio LB (Luria-Bertoni) a 37° C, se inoculó una colonia en 50 mL de medio LB líquido y se incubó a 37° C en agitación constante por 16 a 20 horas o hasta alcanzar 0.4 a OD₆₀₀. Las bacterias de los 50 mL de cultivo se empastillaron centrifugando a 7,000 rpm (4,600 g) por 5 min a 4°C. El sobrenadante decantó y la pastilla se resuspendió en 5 ml (1/10) de 100 mM CaCl₂ frío, dejándolo en hielo por 10 minutos; posteriormente se volvió a centrifugar 7,000 rpm (4,600 g) por 5 min a 4° C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 ml (1/25) de CaCl₂ (100mM) dejándolo sobre en hielo por 30 minutos.

Transformación de bacterias Ca²⁺-competentes

Se tomó un volumen de 200 µL de las células competentes de *E. coli* DH5α (*recA*) y se agregó 5 uL de la reacción de ligación del inserto en el vector de clonación pJET1.2/Blunt; esta solución se incubo en hielo por 5 minutos y se sometió a choque térmico incubándolo a 42° C por 90 segundos (ó 37° C por 5 min) y posteriormente en hielo por 2 minutos. Se adicionaron 800 µL de medio LB estéril precalentado a 37° C, se incubó a 37°C por 45 min. Al término del tiempo se sembraron por espatulación 200uL de la suspensión en cajas de LB/ampicilina (50 µL/mL) y se incubaron a 37° C por 24 h, para seleccionar las bacterias que adquirieron el plásmido.

Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina

El DNA plasmídico se obtuvo de colonias aisladas, por lo que se tomó una colonia con un asa de cada una de las cajas con medio LB/ampicilina (50 µL/mL) teniendo cuidado de no tomar las colonias satélites. Se inoculó la colonia en un tubo con 5mL de LB con 25µL de ampicilina (50 µL/mL) y se dejó crecer a 37° C por 3 hrs o hasta tener una DO₆₀₀ de 0.3.

Posteriormente cada tubo se centrifugó a 7,000 rpm (4,600 g) durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y a la pastilla obtenida se le agregan 150µL de la solución 1 (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM glucosa, 10mM EDTA pH 8.0), se resuspendió la pastilla mezclando en el vortex y se mantuvo en hielo por 5 minutos. A continuación, se agregaron 100 µL de la solución de lisis o solución 2 (NaOH 0.2N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 5 minutos, transcurrido el tiempo se agregó 200µL de la solución 3 (acetato de potasio 5M, ácido acético glacial y H₂O), esta solución se mezcló agitándola suavemente y se dejó incubar en hielo por 5 minutos, prosiguiendo una centrifugación a 12,000 rpm (13,500 g) durante 5 minutos a 4° C.

El sobrenadante se recuperó con una pipeta y se transfirió a un tubo nuevo, al cual se agregaron 600µL de fenol (pH:8.0), posteriormente se agitó en vórtex durante un minuto y se incubó a 65° C por un minuto. A continuación, se adicionaron 300µL de cloroformo y de la misma manera, se agitó durante 1 minuto y se centrifugó 10 min, 12,000 rpm (13,500 g) a 4° C. La fase acuosa obtenida se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionaron 800 µL de etanol absoluto, se llevó a centrifugar a 12,000 rpm (13,500 g) durante 30 min a 4° C y la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70%. Se dejó secar 5 minutos a temperatura ambiente para evaporar el etanol y se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas para ser almacenado a -20° C hasta su uso.

La concentración y la pureza del DNA obtenido se analizó con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Cat#: ND-2000). La concentración de la muestra de ADN se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. Mientras que la pureza

de las muestras se determinó con la relación de absorbancias A260/280 (1.8-2.0 pureza óptima) y A260/230 (1.5-2.2 pureza optima). La integridad del DNA plasmídico se evaluó por fraccionamiento electroforético en geles de agarosa al 1% con buffer 0.5X TBE pH 7.5. El DNA fue teñido usando el reactivo Midori Green (NIPPON GENETICS, #Cat: B4MG04).

Secuenciación de los plásmidos con inserto

Para validar que los plásmidos tengan la secuencia correcta de los productos de PCR de los miRNAs, se realizó una secuenciación tipo Sanger empleando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Cat#:4337455) el cual consta de dos fases como se describe a continuación: Primero se realizó una reacción de PCR Forward y Reverse por separado para cada uno de los plásmidos.

En la reacción Forward se agregaron 2µL BigDye Terminator Sequencing Buffer, 1 µL de BigDye Terminator Ready Reaction Mix, 1 µL del primer Forward pJET1.2/blunt (10µM), 1 µL de DNA del plásmido (900ng/µL) y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen de 20 µL. En la reacción Reverse se agregaron 2µL BigDye Terminator Sequencing Buffer, 1 µL de BigDye Terminator Ready Reaction Mix, 1 µL del primer Reverse pJET1.2/blunt (10µM), 1 µL de DNA del plásmido (900ng/µL) y agua. Posteriormente se colocaron en el termociclador con el siguiente programa (Tabla 4):

Tabla 4. Condiciones de secuenciación

Tiempo	Temperatura	Ciclos
1 min	96°C	1
10 seg	96°C	25
5 seg	55°C	
4 min	60°C	
	4°C	1

En la segunda fase se tienen que purificar los productos de PCR del paso anterior, por lo tanto, se agregaron 5µL EDTA pH 8.0 y 60 µL de etanol absoluto,

posteriormente se mezcló usando “vortex” por 5 segundos y se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 hora. Pasado este tiempo se centrifugaron a 12,000 rpm (13,500 g) por 30 minutos; se descartó el sobrenadante con una pipeta tratando de no remover la pastilla de DNA del fondo del tubo. A continuación, se agregaron 250µL de etanol frío al 70%, se mezcló el tubo por inversión 5 veces (no usar vortex) y se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm (13,500 g) a 4° C; de la misma manera se descartó el sobrenadante con una pipeta y se volvieron a agregar 250µL de etanol al 70%. Se removió con una pipeta el sobrenadante y se dejó secar el tubo a temperatura ambiente por 10 minutos, se guardó el tubo a 4° C sin resuspender y la secuenciación se analizó en el equipo ABI Prism 310 (Applied Biosystem).

La calidad de la secuenciación se comprobó en el programa FinchTV v1.4 (<https://finchtv.software.informer.com/1.4/>), donde picos en el electroferograma altos y delgados indican una mayor probabilidad de que sea la base correcta en la secuencia. Posteriormente se usó el programa CLC Workbench v8.1.3 y el programa Vector NTI 11 (<https://vector-nti.software.informer.com/11.0/>) para analizar los datos de las secuencias forward y reverse, y así, encontrar la secuencia de interés de cada uno de los miRNAs. Primero se hizo un Blast con la secuencia completa del plásmido pJET1.2 para determinar si los productos de PCR se insertaron en el sitio “blund-end”, luego se hicieron alineamientos para determinar si tanto el miRNA como los primers en stem loop estaban presentes en el plásmido clonado.

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real (qPCR) es una técnica ampliamente utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar los productos. La cuantificación de los miRNAs inmunorregulatorios se realizó por triplicado utilizando el kit comercial qPCR Maxima SYBR Green/ROX 2X (Thermo Scientific, Cat# K022). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl de reacción 12.5 µL Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (10X), 0.8 µL primer forward (10µM)

específico para cada miRNA, 0.8 µL primer URP (10µM), 3 µL de cada plantilla de cDNA (≤500 ng) y agua libre de nucleasas para completar el volumen. El intercalante SYBR Green I permite la detección del cDNA sin utilizar sondas de secuenciación específica. Posteriormente se colocaron los tubos sobre la platina del termociclador StepOne Real-Time PCR System, (Applied Biosystems, cat#4376357) con el siguiente programa (Tabla 5):

Tabla 5. Condiciones para la amplificación

Tiempo	Temperatura	Ciclos
10 min	95°C	1
15 seg	95°C	35
30 seg	60°C	
30 seg	72°C	
10 min	72°C	1
∞	4°C	1

El proceso de normalización de los datos de fluorescencia es esencial para un proceso correcto de cuantificación de los niveles de miRNA. Sin embargo, en la leche no hay suficientes datos de controles endógenos, así que se normalizaron por el método $\Delta\Delta C_t$ con la concentración conocida del miRNA cel-39 que se adiciona desde la extracción de RNA. Para determinar experimentalmente la eficiencia de la qPCR, se generó una curva estándar del miRNA cel-39, mediante la realización de una qPCR a partir de diluciones seriadas. La determinación de la eficiencia resulta una herramienta excelente para probar la eficiencia del ensayo, la precisión, la sensibilidad y el rango de trabajo, y es calculada a partir de la pendiente de la recta usando la ecuación: Eficiencia = $10^{(-1 / \text{pendiente})} - 1$.

Si, finalmente, la PCR es 100% eficiente, la cantidad de cDNA se doblará con cada ciclo y la pendiente de la curva estándar será -3.33 ($100 = 100\% = 10^{(-1 / -3,33)} - 1$). Por tanto, una pendiente entre -3.9 y -3,0 (Eficiencia 80 a 110%) es aceptable.

XI. Resultados

Resultados del Objetivo Específico 1. Seleccionar 50 muestras del banco de leche materna de nuestro laboratorio.

Se obtuvieron 50 muestras de leche materna del Banco de Leche Humana del laboratorio 0, estas muestras se seleccionaron con base en los criterios de inclusión y exclusión por lo que solo se consideraron las muestras de mujeres que no consumieron antibióticos en el embarazo, no fumaban y no tuvieran síndrome metabólico, obesidad o diabetes mellitus tipo 1 y 2. Todas las participantes en este estudio tuvieron un embarazo a término y las muestras de leche se tomaron entre el primero y sexto día postparto, que corresponden a calostro y leche de transición. Las características sociodemográficas se describen en la tabla 6 y los parámetros clínicos se presentan en la tabla 7 con el promedio y desviación estándar, los datos completos se pueden encontrar en el Anexo 2.

Tabla 6. Características sociodemográficas de la población estudiada

Parámetro	n	%
Procedencia		
Estado de México	22	44
Ciudad de México	17	34
Puebla	3	6
Oaxaca	5	10
Veracruz	1	2
Hidalgo	2	4
Nivel de estudios		
Primaria	14	28
Secundaria	10	20
Preparatoria	23	46
Universitaria	3	6
Ocupación		
Estudiante	2	4
Ama de casa	44	88
Empleada	4	8
Paridad		
Primípara	8	16
Múltipara	42	84

Tabla 7. Características clínicas de la población estudiada

Parámetro	Promedio
Edad	23.98± 5.1
Estatura	1.57± 0.1
Peso AE	57.52± 9.3
IMC AE	23.37± 3.1

IMC: índice de masa corporal, AE, antes del embarazo.

Se observó que la mayoría de las participantes proviene del Estado de México (44%) y de la Ciudad de México (34%), también se encontró que algunas provenían de otros estados como Oaxaca (10%), Puebla (6%), Hidalgo (4%) y Veracruz (2%). La principal ocupación de las participantes es ama de casa (88%), mientras que un pequeño porcentaje trabaja (8%) o estudia (4%), siendo la preparatoria el mayor nivel de estudios en la mayoría de las participantes (46%). Cabe destacar que el 84% de las participantes es múltipara (más de un parto) y solo el 16% de las mujeres es primípara (un solo parto).

En los parámetros clínicos se determinó que las participantes tienen una edad promedio de 23.98± 5.1, una estatura promedio de 1.57± 0.1 y un peso promedio de 57.52± 9.3. El índice de masa corporal antes del embarazo (IMC AE) nos ayudó a excluir a las mujeres se encontraban en la categoría de obesidad tipo 1 (IMC=30 a 34,9) y solo se seleccionaron las muestras de mujeres que tuvieran IMC menores a 30, obteniendo un IMC promedio de 23.37± 3.1.

Resultados del Objetivo Específico 2. Seleccionar 5 miRNAs inmunoregulatorios de interés con base a su importancia en el desarrollo neonatal.

La revisión bibliográfica permitió seleccionar 5 miRNAs inmunorregulatorios: miR-155-5p, miR-148a-3p, miR-181a-5p, miR-146b-5p y miR-200a-3p, los cuales se han encontrado en alta concentración en la leche materna humana y desempeñan un papel importante en la regulación del sistema inmune al participar en la inmunidad innata y adquirida (Tabla 8):

Tabla 8. miRNAs inmunorregulatorios seleccionados

miRNAs	Función	Secuencia 5'→3'
miR-155-5p	Relacionado con la diferenciación de las células T y B. Es necesario para generar anticuerpos (Lindsay M., 2008).	UUA-AUG-CUA-AUC-GUG-AUA-GGG-GUU
miR-148a-3p	Promueve la diferenciación de monocitos en macrófagos (Huang <i>et al.</i> , 2017).	UCA-GUG-CAC-UAC-AGA-ACU-UUG-U
miR-181a-5p	Regulador clave en el desarrollo, activación y diferenciación de células T (Ye <i>et al.</i> , 2018).	AAC-AUU-CAA-CGC-UGU-CGG-UGA-GU
miR-146b-5p	Regula la proliferación de células inmunes e inhibe las respuestas inflamatorias (Lee <i>et al.</i> , 2016).	UGA-GAA-CUG-AAU-UCC-AUA-GGC-UG
miR-200a-3p	Su sobreexpresión está relacionada con la diferenciación de células T auxiliares, especialmente en células Th17 (Zárate-Neira <i>et al.</i> , 2017).	UAA-CAC-UGU-CUG-GUA-ACG-AUG-U

Resultados del Objetivo Específico 3. Diseñar iniciadores (primers) en stem-loop útiles para la transcripción reversa y PCR en tiempo real de los miRNAs seleccionados.

Para detectar los miRNAs en la leche se emplearon oligonucleótidos específicos que permitan su cuantificación. De acuerdo a lo recomendado por Kramer M. F. (2011), se diseñaron primers en stem-loop para cada miRNA seleccionado, que proporcionan una gran especificidad, amplificando específicamente las formas maduras de los miRNAs. Se verifico que los primers en stem-loop contengan la secuencia complementaria al miRNA blanco y que mantengan la estructura en tallo-bucle. La secuencia de cada uno de los oligonucleótidos se describe a continuación:

Tabla 9. Secuencias de los oligonucleótidos para cuantificación de miRNAs por RT-qPCR

Oligo	Secuencia 5'→3'	-mer
RTmiR148	GTC-GTA-TCC-AGT-GCA-GGG-TCC-GAG-GTA-TTC-GCA-CTG-GAT-ACG-ACA-CAA-AG	50
FmiR148	AAG-CTT-CAG-TGC-ACT-ACA-GAAC	22
RTmiR181	GTC-GTA-TCC-AGT-GCA-GGG-TCC-GAG-GTA-TTC-GCA-CTG-GAT-ACG-ACA-CTC-AC	50
FmiR181	TAC-TGA-ACA-TTC-AAC-GCT-GTC-G	22
RTmiR146	GTC-GTA-TCC-AGT-GCA-GGG-TCC-GAG-GTA-TTC-GCA-CTG-GAT-ACG-ACC-AGC-CT	50
FmiR146	CTC-CGA-GTG-AGA-ACT-GAA-TTC-C	22
RTmiR200	GTC-GTA-TCC-AGT-GCA-GGG-TCC-GAG-GTA-TTC-GCA-CTG-GAT-ACG-ACA-CAT-CG	50
FmiR200	GGC-AGT-AAC-ACT-GTC-TGG-TAA-C	22
RTmiR155	GTC-GTA-TCC-AGT-GCA-GGG-TCC-GAG-GTA-TTC-GCA-CTG-GAT-ACG-ACA-ACC-CC	50
FmiR155	GCG-TCT-CCT-TAA-TGC-TAA-TCG-TG	23
RTcel39	GTC-GTA-TCC-AGT-GCA-GGG-TCC-GAG-GTA-TTC-GCA-CTG-GAT-ACG-ACC-AAG-CT	50
Fcel39	CTG-CGT-CAC-CGG-GTG-TAA-ATC-A	22
URP	TAT-CCA-GTG-CAG-GGT-CCG-A	19

RT: oligo para la retrotranscripción, F: oligo forward, URP: Oligo reverso universal.

Se comprobó que los primers forward tuvieran una homología con los primeros 12-17 nucleótidos del extremo 5' del miR maduro y se agregaron nucleótidos en el 5' del oligo para tener una Tm cercana a 60°C. (Tabla 10).

Una vez diseñados los primers se prosiguió a demostrar la presencia de los miRNAs en las muestras de leche y de fórmula láctea. Por lo que se extrajo el RNA total y se sintetizó cDNA con los primers en stem-loop (Tabla 7). Posteriormente se realizó la RT-PCR de punto final con los primers Forward y URP, los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% con buffer 0.5X TBE pH 7.5 (Figura 7).

Tabla 10. Temperatura de fusión de los oligonucleótidos para la cuantificación de miRNAs por RT-qPCR

Oligo	Temperatura óptima para RT	Temperatura óptima para PCR con primer URP
RTmiR148	87.4° C	-----
FmiR148	-----	60.2° C
RTmiR181	87.9° C	-----
FmiR181	-----	62.9° C
RTmiR146	89.2° C	-----
FmiR146	-----	62.1° C
RTmiR200	88.9° C	-----
FmiR200	-----	62.6° C
RTmiR155	89.2° C	-----
FmiR155	-----	63.2° C
RTcel39	88.3° C	-----
Fcel39	-----	61.0° C
URP	-----	-----

-----, no aplica. RT: oligo para la retrotranscripción, F: oligo forward, URP: Oligo reverso universal

Para comprobar que la técnica de RT-PCR se hizo correctamente se metió un control positivo con el RNA del gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de 496 pb, el cual se observa en el carril 2 (Figura 7) y corresponde con el tamaño esperado de 496 pb.

El segundo control positivo es el miRNA-21 (carril 8, Figura 7) el cual se utilizó en un trabajo previo (Mendoza D. L., 2012) con primers en “stem-loop” específicos para amplificar el miRNA-21 en plasma sanguíneo y se ha reportado su presencia en la leche humana (Benmoussa & Provost, 2019), así podemos asegurar que los primers diseñados en este trabajo son correctos y amplifican los fragmentos esperado de 75pb para cada uno de los miRNAs seleccionados (carril 3-7, Figura 7). Para el control negativo se realizó la reacción de RT-PCR sin cDNA donde gel de agarosa no se visualizó ninguna banda (carril 9, Figura 7).

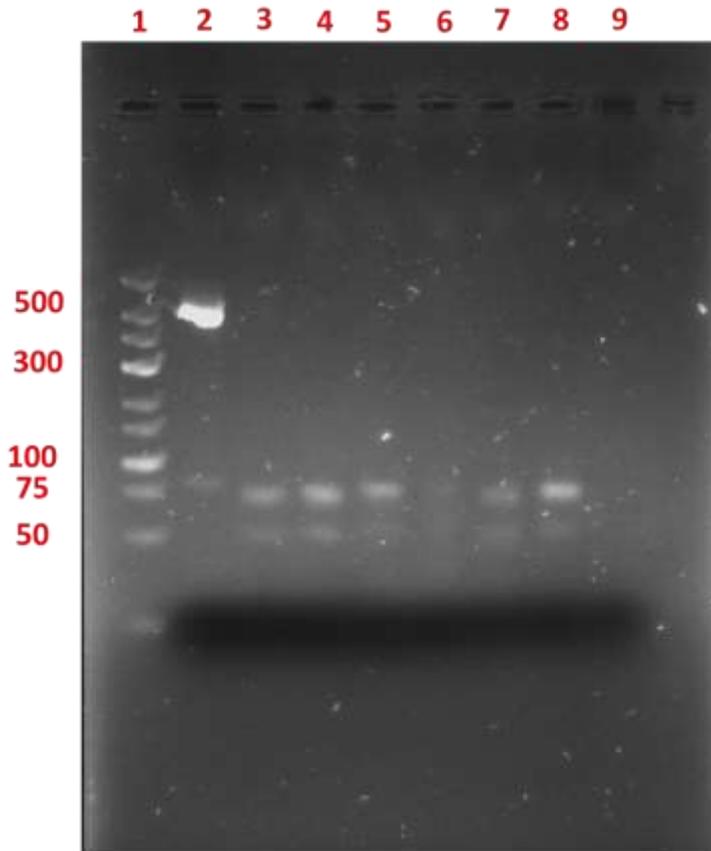


Figura 7. Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% con los amplicones de PCR de punto final de cada uno de los miRNAs seleccionados. 1: Marcador de peso molecular de 25 pb, 2: Control (+) GAPDH (496 pb), 3: miRNA-148, 4: miRNA-181, 5: miRNA-146, 6: miRNA-155, 7: miRNA-200, 8: miRNA-21, 9: Control (-) sin cDNA molde.

Para comprobar que los primers se están uniendo a los miRNAs en la leche y no a otros blancos, los amplicones de PCR de punto final se ligaron al plásmido pJET1.2/blunt. Se transformaron las células competentes (800 μ L) de *E. coli* DH5 α (recA) con el plásmido ligado, se sembraron por espatulación 200 μ L de la suspensión de bacterias competentes en medio LB (sin antibiótico), en medio LB + Ampicilina (50 μ g/mL Amp) y las bacterias de los 600 μ L restantes fueron empastilladas, resuspendidas en 200 μ L y sembradas en medio LB + Amp (50 μ g/mL Amp) como se describe en la Tabla 11.

Tabla 11. Número de colonias obtenidas de la transformación de *E. coli* DH5 α (recA)

ligación	LB (200 μ L)	UFC en LB Amp (200 μ L)	UFC en LB Amp (600 μ L)
Control (+): Fragmento de PCR del kit	cm	3	14
Control (-): Sin fragmento de PCR	cm	0	10
Control (-): No plásmido	cm	0	0
pJET1.2 + miRNA146	cm	96	185
pJET1.2 + miRNA 148	cm	101	237
pJET1.2 + miRNA 181	cm	117	164
pJET1.2 + miRNA 155	cm	60	246
pJET1.2 + miRNA 200	cm	84	213

cm. crecimiento masivo; LB Amp, medio sólido con 50 μ g/mL ampicilina.

El plásmido pJET1.2/blunt proporciona resistencia a ampicilina, seleccionándose aquellas bacterias que poseen el plásmido, así, las células crecidas en medio LB (sin antibiótico) crecen masivamente, mientras que aquellas bacterias sin plásmido que se sembraron en medio LB Amp no mostraron crecimiento como se observa en el Control (-) sin plásmido.

El kit de clonación pJET1.2/blunt proporciona un fragmento de 976 bp como control positivo, sin embargo, se observó un bajo rendimiento de la transformación con 3 colonias en el medio LB Amp (200 μ L). Mientras que se obtuvo el mayor número de colonias transformadas (117 UFC) con el plásmido ligado pJET1.2 + miRNA 181 en las cajas con LB Amp50 (200 μ L) y (246 UFC) con el plásmido pJET1.2 + miRNA 148 en el medio LB Amp (600 μ L).

Conforme a lo esperado el control negativo (sin fragmento de PCR) mostro un bajo rendimiento de UFC, pero se obtuvieron 10 colonias en las cajas de LB Amp (600 μ L), lo que indica que puede haber falsos positivos en los plásmidos ligados.

A pesar de que obtuvimos un gran número de colonias de la transformación de *E. coli* DH5 α (recA) no podemos asegurar que los plásmidos tengan la secuencia del miRNA de interés, por lo que se tomaron colonias aisladas que

tienen el plásmido recombinante y se resembraron para poder extraer el plásmido por lisis alcalina.

Se verificó que los plásmidos extraídos no estuvieran degradados, estos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer 0.5X TBE pH 7.5 (40 mM de Tris, 45 mM de Ácido bórico y 1 mM de EDTA). En la figura 8, se muestra el plásmido ligado de cada una de las clonas, nombradas así por el miRNA que se ligó en el vector pJET1.2/blunt, se observa una sola banda del mismo tamaño, lo que indica que los plásmidos no están degradados.

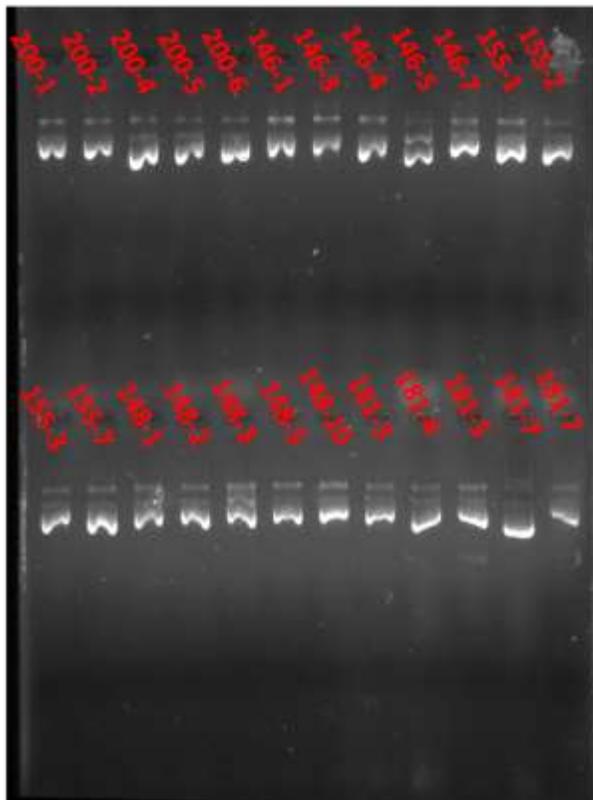


Figura 8. Gel de agarosa al 1% con los plásmidos ligados extraídos por lisis alcalina. Se observa que los plásmidos de cada una de la clonas están íntegros.

Para comprobar que las clonas tengan el plásmido con el inserto de los miRNAs, el kit recomienda hacer un análisis de restricción para insertos grandes mayores a 3kb, mientras que para insertos pequeños menores a 3kb se debe realizar una PCR confirmatoria con los primers Forward y Reverse del kit de pJET1.2/blunt.

El primer forward amplifica de la base 310-332, mientras que el primer reverse amplifica de la base 405-426 de pJET1.2/blunt. Si no se insertó ningún producto de PCR se esperaría un amplicón de 118pb. Por otro lado, si se insertó el producto de PCR de cada de uno de los miRNAs amplificados con un tamaño de 75 pb, se esperaría un fragmento de 193 pb. En la Figura 9 se muestra el gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% con los productos de PCR de punto final.

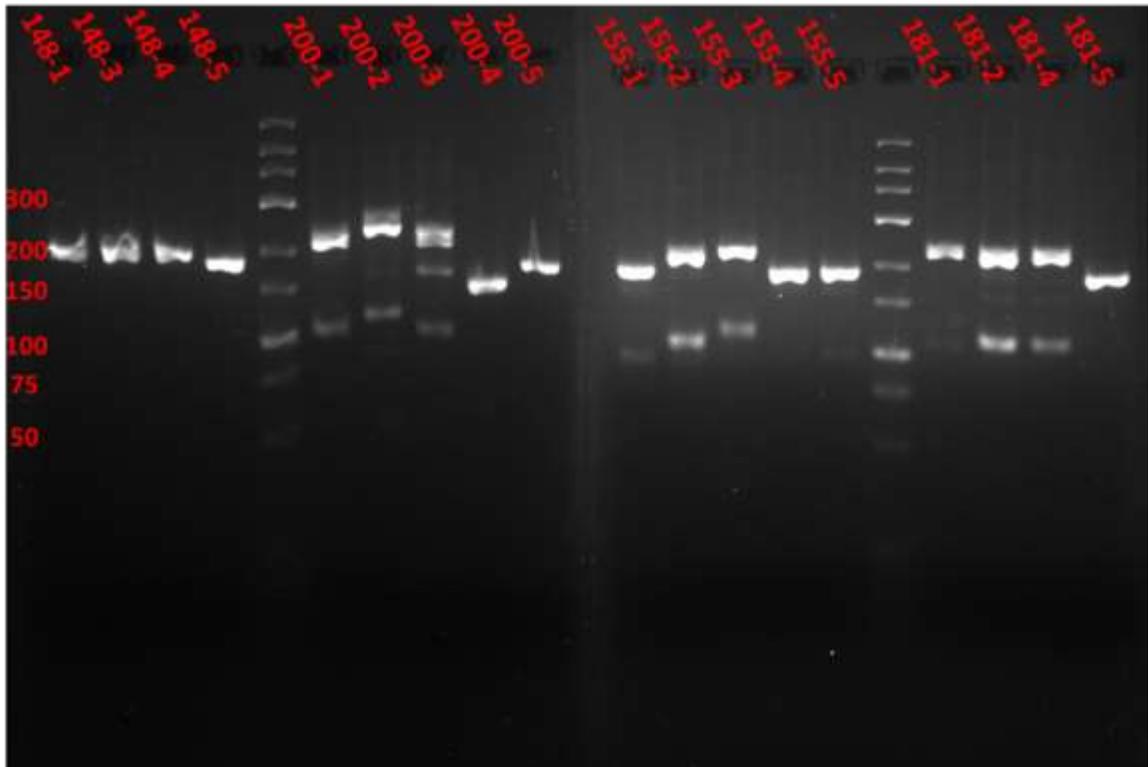


Figura 9. Gel de agarosa al 4% de bajo punto de fusión con los productos de PCR de cada una de las clonas con los miRNAs seleccionados. Las clonas positivas poseen un tamaño de 193.

Como se puede observar en la Figura 9, las clonas que produjeron por PCR un producto de 193 pb resultan positivas a la clonación con el miRNA de interés. Las clonas 148-1, 148-3, 148-4, 200-5, 155-1, 155-4, 155-5, 181-5 tuvieron el tamaño esperado de 193 por lo que con estas clonas se prosiguió a la secuenciación.

Se realizaron más ensayos para tener un mayor número de clonas positivas con el inserto de cada miRNA, como se observa en la Figura 10.

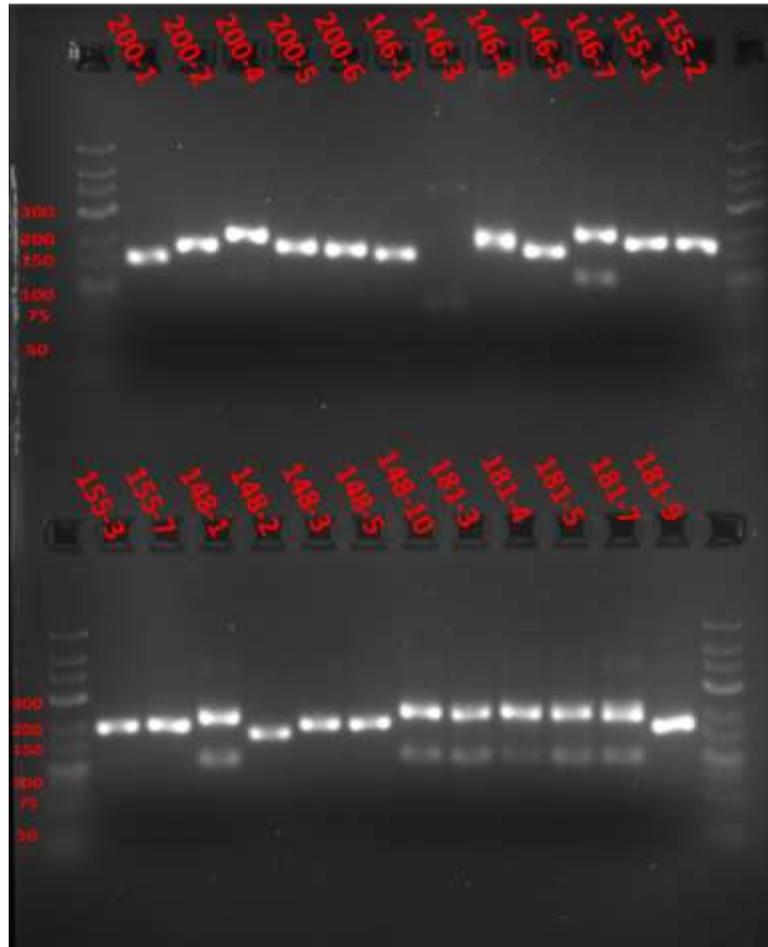


Figura 10. Gel de agarosa al 4% de bajo punto de fusión con los productos de PCR de cada una de las clonas con los miRNAs seleccionados. Las clonas positivas poseen un tamaño de 193.

Si bien los productos de la reacción de PCR tienen el tamaño esperado de 193pb, no se puede asegurar que la secuencia amplificada corresponda con el miRNA en cuestión o pueda ser un producto inespecífico. A continuación, se secuenciaron los plásmidos de 5 colonias que habían dado positivo al tamaño esperado del amplicon en la PCR.

Los miRNAs amplificados con los primers stem-loop son muy pequeños (75 pb), al tratarse de secuencias tan pequeñas es muy difícil secuenciarlos, por ello se clonaron en un vector bacteriano que permite su secuenciación.

En la Figura 11 se observa el plásmido recombinante de pJET1.2 + miRNA 148, el inserto del miRNA 148 se encuentra entre el sitio AT Blunt-end 371 y AT

Blunt-end 372, interrumpiéndose el gen letal del plásmido y permitiendo su supervivencia. Se realizó un alineamiento del plásmido recombinante con la secuencia del miRNA 148 reportada en la base de datos miRBase 22.1, teniéndose una homología del 100% como se muestra en la Figura 11B.

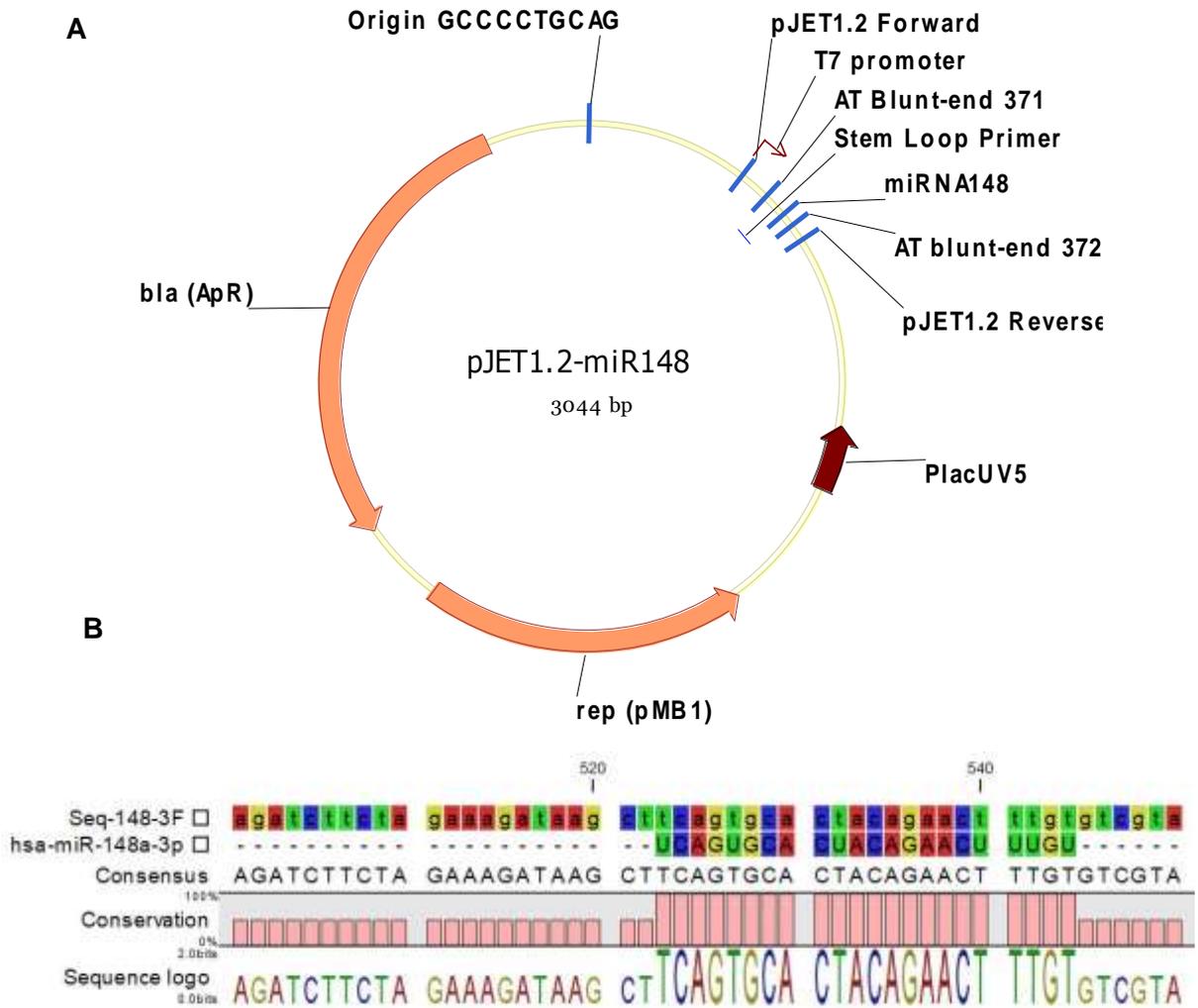


Figura 11. Plásmido recombinante de pJET1.2+miR148. A) Mapa genético del plásmido en el que se observa donde se insertó el miRNA 148. B) Alineamiento de la secuenciación con el miRNA 148. La secuencia consenso se encuentra resaltada y las barras rojas nos indican un 100% de homología. Alineamiento realizado en el programa CLC Workbench.

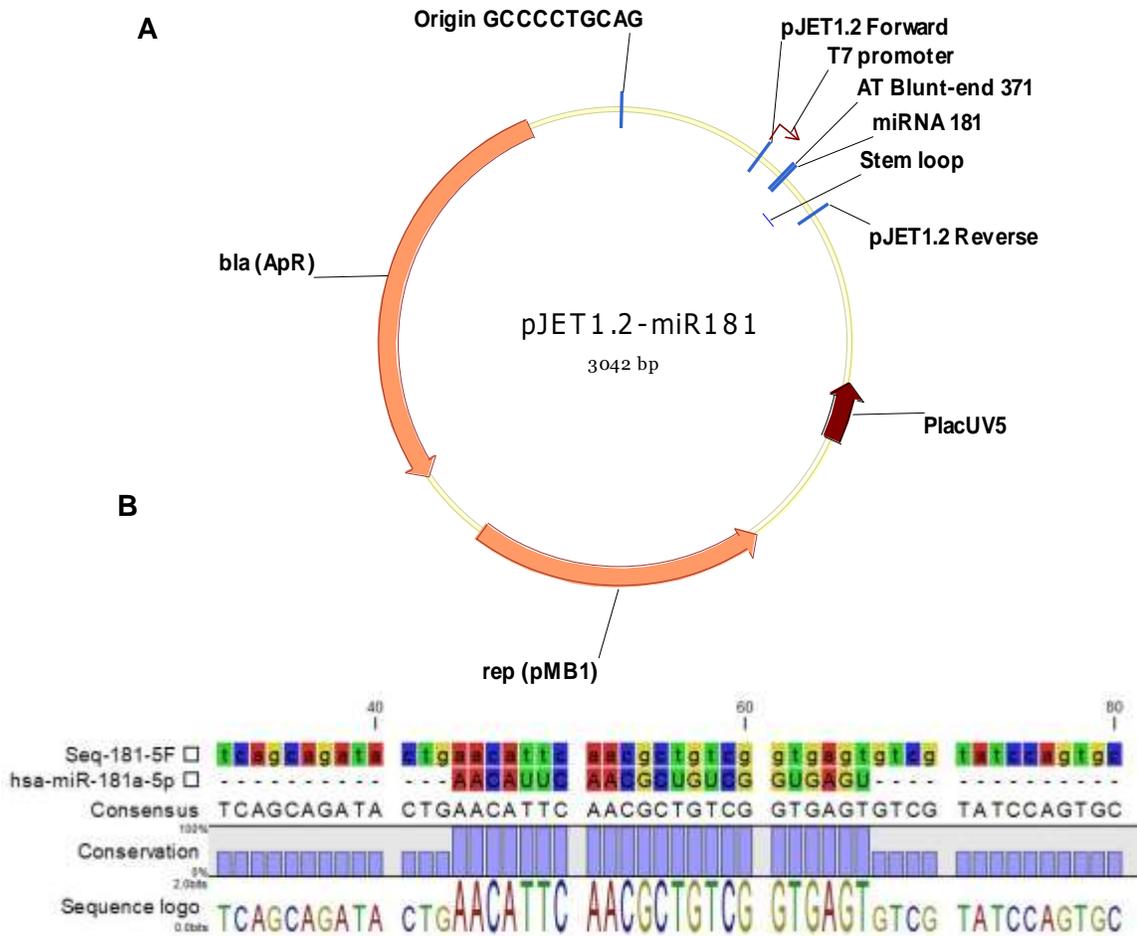


Figura 12. Plásmido recombinante de pJET1.2+ miR181. A) Mapa genético donde se observa el lugar de inserción del miRNA 181. B) Alineamiento de la secuenciación con el miRNA 148. La secuencia consenso se encuentra resaltada y las barras moradas nos indican un 100% de homología. Alineamiento realizado en el programa CLC Workbench.

De la misma manera se secuenció el plásmido recombinante de pJET1.2 + miR181, se pudo comprobar la secuencia del miRNA 181 por el alineamiento con la secuencia de la miRBase. Cabe destacar que también se secuenció el primer en stem-loop, (Figura 12) que permitió la transcripción reversa del miRNA 181 y servirá para la amplificación en la PCR de tiempo real.

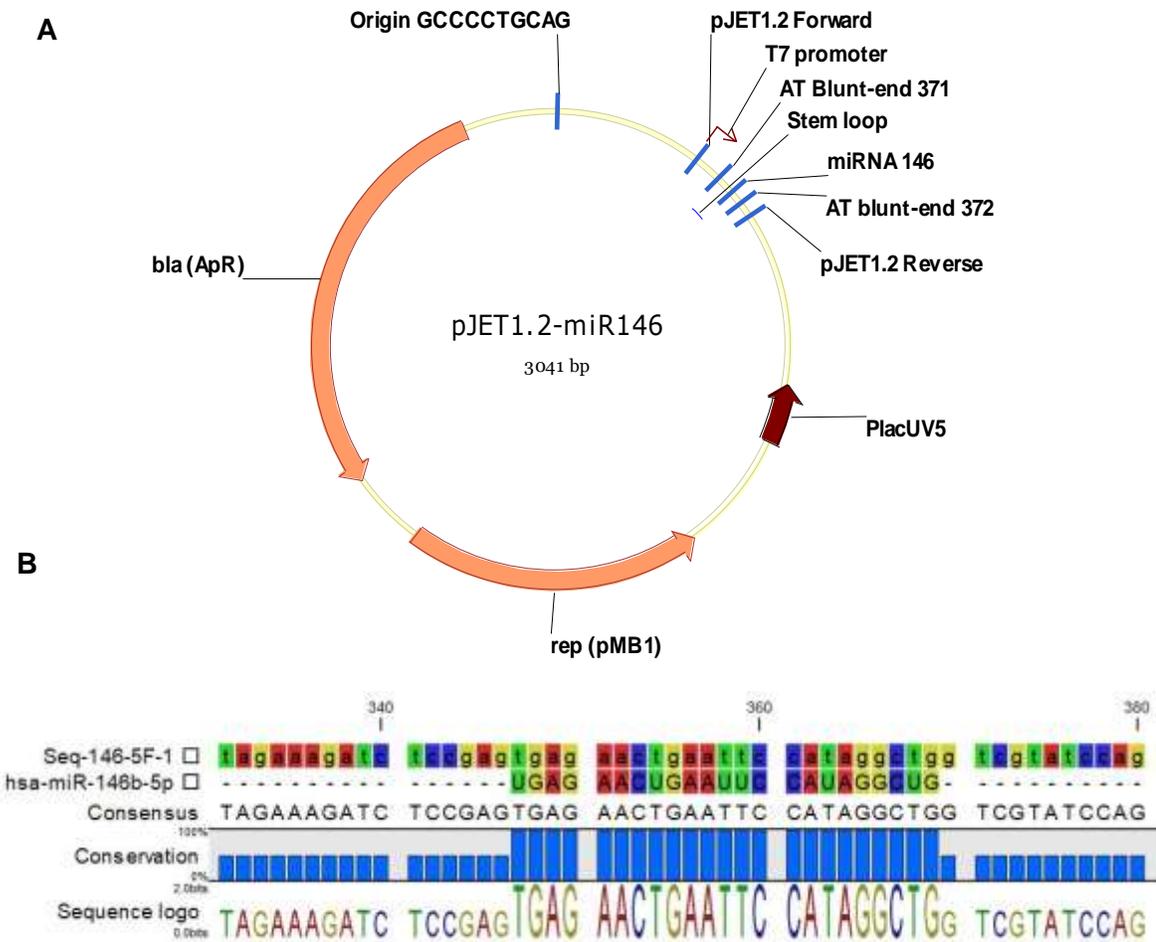


Figura 13. Plásmido recombinante de pJET1.2+miR146. A) Mapa genético del plásmido en el que se observa donde se insertó el miRNA 148. B) Alineamiento de la secuenciación con el miRNA 148. La secuencia consenso se encuentra resaltada y las barras azules nos indican un 100% de homología. Alineamiento realizado en el programa CLC Workbench.

El plásmido recombinante pJET1.2+ miR146, se muestra a continuación (Figura 13), con la secuencia del miRNA 146 insertada en el sitio Blunt-end del plásmido. Esta secuencia tiene un 100% de homología con la reportada en miRBase, por lo que podemos asegurar que este miRNA se encuentra presente en la leche.

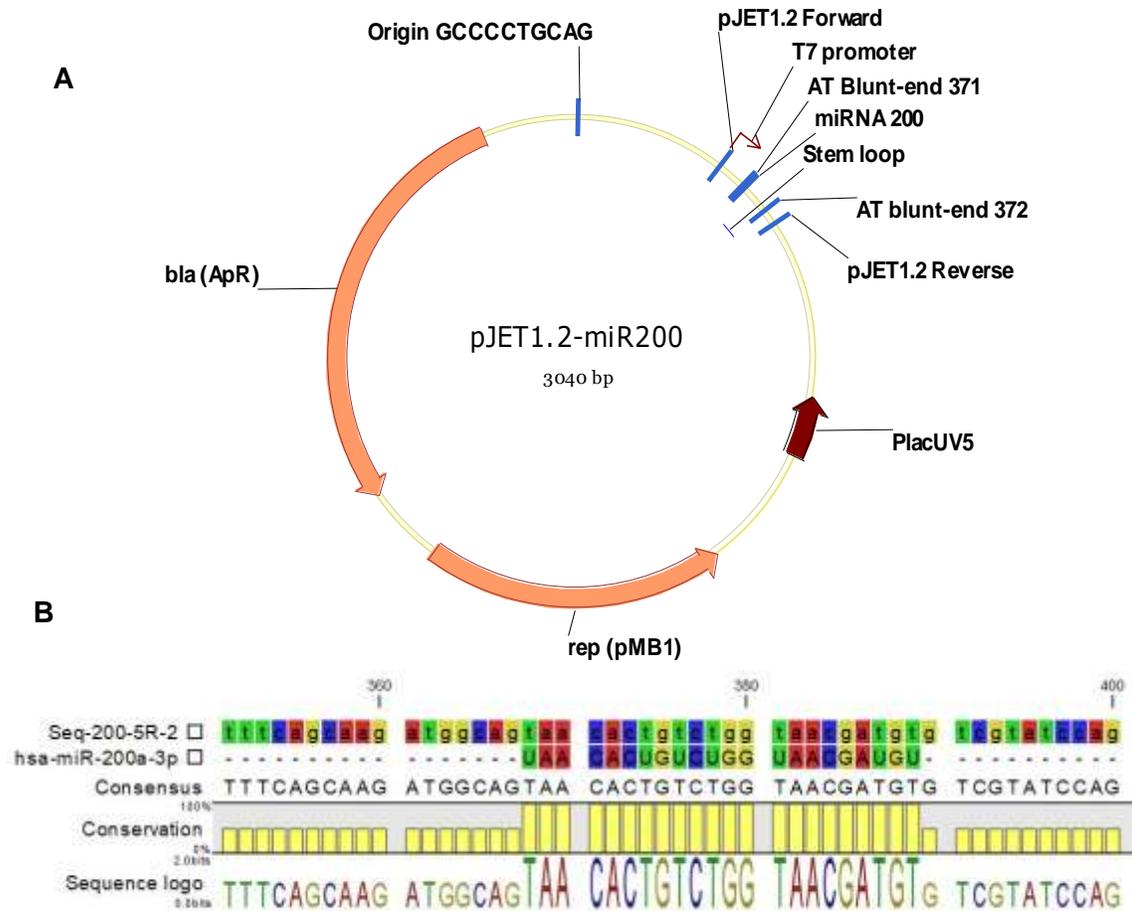


Figura 14. Plásmido recombinante de pJET1.2+miR200. A) Mapa genético del plásmido en el que se observa donde se insertó el miRNA 200. B) Alineamiento de la secuenciación con el miRNA 200. La secuencia consenso se encuentra resaltada y las barras amarillas nos indican un 100% de homología. Alineamiento realizado en el programa CLC Workbench.

De la misma manera se encontró la secuencia del miRNA 200 en el plásmido recombinante secuenciado de pJET1.2+miR200 con un 100% de homología en el alineamiento, como se observa en la Figura 14, la secuencia consenso se encuentra resaltada en letras grandes.

Por último, se secuenció el plásmido recombinante pJET1.2+miR155 donde se observa que el miRNA 155 se insertó en el sitio blunt-end con su primer en stem-loop (Figura 15). El alineamiento de la molécula secuenciada con la secuencia del miRNA 155 (miRBase) arrojó que el 100% de las bases

correspondían, en la figura 14B se puede observar que las bases iguales tienen los mismos colores y las barras mostraban un 100% de conservación en las bases semejantes.

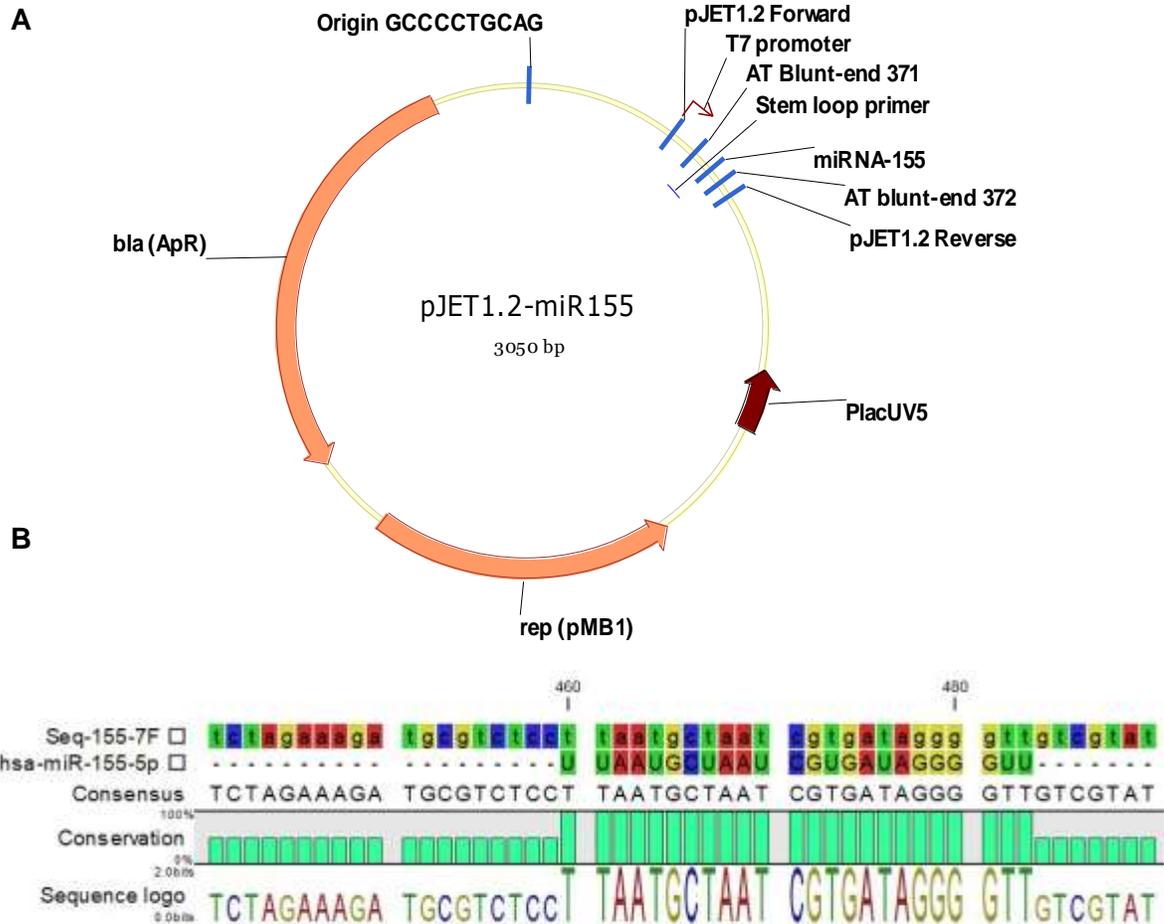


Figura 15. Plásmido recombinante de pJET1.2+miR155. A) Mapa genético del plásmido en el que se observa donde se insertó el miRNA 155. B) Alineamiento de la secuenciación con el miRNA 155. La secuencia consenso se encuentra resaltada y las barras verdes nos indican un 100% de homología. Alineamiento realizado en el programa CLC Workbench.

Con la secuenciación de estos plásmidos pudimos corroborar que la técnica de RT-PCR con los primers en stem-loop diseñados es efectiva para la detección y amplificación de los miRNAs en la leche.

Resultados del Objetivo Específico 4. Cuantificar los niveles de los 5 miRNAs seleccionados en las muestras de leche materna y fórmula láctea seleccionadas.

Para cuantificar la concentración de los 5 miRNAs en la leche materna y de fórmula primero se tiene que estandarizar la curva de amplificación con el miRNA sintético cel-39. Este trabajo no fue realizado debido a contingencia por COVID-19. Enseguida, se presentan resultados esperados en caso se validará la hipótesis de trabajo.

Esto se realizaría con diluciones seriadas del miRNA sintético, a mayor concentración del miRNA se obtendrían valores de Ct más pequeños y a menor concentración de cel-39 se obtendrían valores más altos de Ct. A partir de las curvas de amplificación se obtendría una ecuación lineal por medio de una regresión lineal.

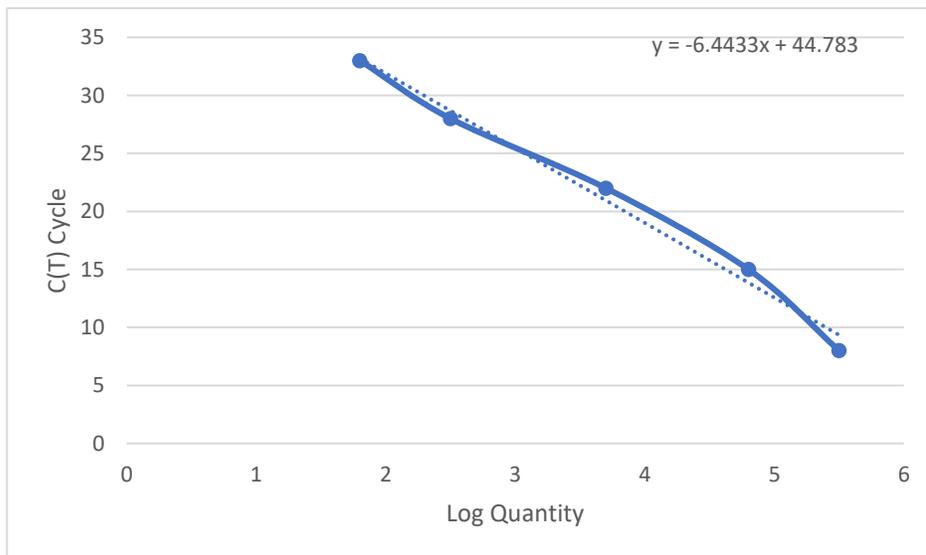


Figura 16. Regresión lineal de la curva estándar, Ct's versus el logaritmo de la cantidad de miRNA cel-39 (resultados esperados).

Las cuantificaciones relativas por $\Delta\Delta Ct$ de cada grupo por triplicado se representan en la Figura 17. Se espera una concentración menor de los miRNAs inmunorregulatorios debido al proceso de elaboración de la fórmula láctea, la leche

materna conserva su contenido de grasa de la fracción lipídica donde se encuentra el mayor número de miRNAs según la literatura. El miRNA 148 a-3 p se espera en concentraciones altas tanto en la leche materna como en la leche de formula debido a que este miRNA se ha encontrado en la leche de vaca en altas concentraciones. Cabe destacar que este miRNA tiene una secuencia idéntica en la leche de vaca y de humano, y se considera que esta conservado evolutivamente por presentarse en la leche de muchos mamíferos, por lo que se espera que también esté presente en la formula láctea.

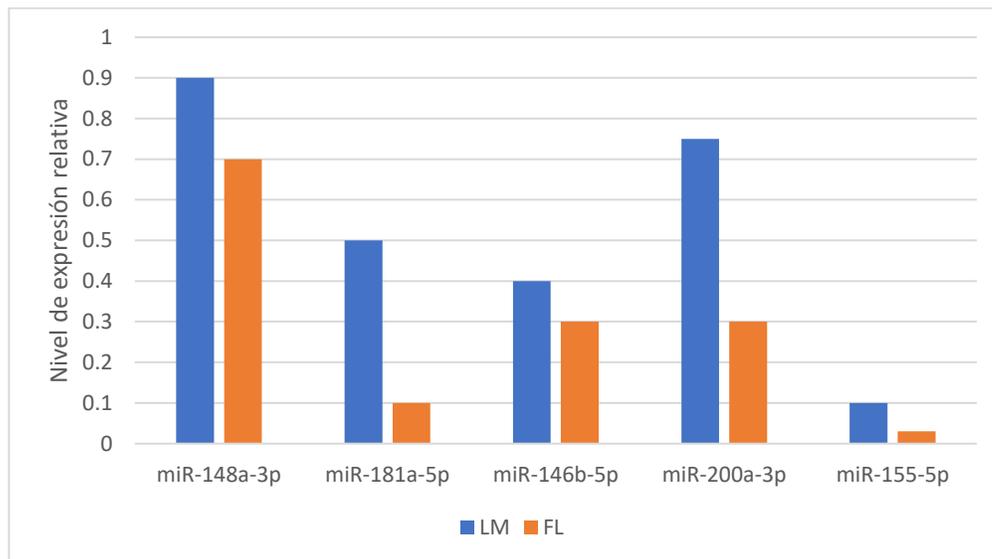


Figura 17. Cuantificación relativa de los miRNAs en la leche humana y formula láctea. LM: Leche materna. FL: Formula Láctea (resultados esperados).

XII Discusión

La leche humana aporta muchos beneficios a los infantes por lo que se han estudiado ampliamente sus componentes nutricionales y factores bioactivos, sin embargo, los mecanismos moleculares que permiten la transferencia de los beneficios inmunitarios o metabólicos no se comprenden de manera completa.

Los miRNAs inicialmente se conocían a nivel intracelular, pero estas biomoléculas también se han encontrado en varios fluidos biológicos como sangre, orina, sudor, saliva, lágrimas y leche (Weber *et al.*, 2010). La leche materna es

una de las fuentes más ricas de miRNAs de los fluidos corporales, y se han reportado 1467 miRNAs maduros (Alsaweed *et al.*, 2015).

Al momento de nacer el infante tiene un sistema inmune inmaduro, siendo una etapa muy vulnerable para él neonato, así en este trabajo estudiamos 5 miRNAs inmunorregulatorios que se destacan por su papel en el desarrollo del sistema inmune innato y adquirido en la leche de madres mexicanas. Debido a que muchas madres optan por una alimentación alternativa para sus infantes, también se estudiaría la fórmula láctea, con el fin de analizar si estos 5 miRNAs se encuentran en la fórmula láctea y si presentan la misma concentración.

Las características de las madres se resumen en la tabla 6 y 7, entre ellas destacan el IMC, este parámetro nos ayudó a discriminar que muestras podían ocuparse para este estudio. Se tomaron las recomendaciones de la OMS (Bajo peso: $IMC < 18,5$; Normal: $\geq 18,5$ y $< 24,9$; Sobrepeso: ≥ 25 y < 30 ; Obesidad ≥ 30) y se tomaron aquellas muestras menores a 30 (OMS & UNICEF, 2003).

No se tomaron valores mayores debido a que en un estudio observaron que la expresión de varios miRNAs se vio alterada por la dieta materna, especialmente por una ingesta alta en grasas. Encontraron que los miRNAs miR-67 y miR-27 se encontraban mayormente expresados en la leche de mujeres con una dieta alta en grasas. Sugieren que los miRNAs están enriquecidos en glóbulos de grasa de la leche materna, y la expresión está regulada por la dieta materna (Munch *et al.*, 2013). Esto sugiere que las alteraciones en la cantidad y el tipo de expresión de miRNA en la leche materna podrían representar una regulación materna dinámica de la expresión génica infantil basada en entornos cambiantes y especialmente con perturbaciones significativas de la dieta materna. Dado que la lactancia ayuda a las madres y a la descendencia a adaptarse a un suministro de alimentos en constante cambio, esto podría proporcionar una ventaja evolutiva a la descendencia (Dall & Boyd, 2004; Munch *et al.*, 2013).

Se seleccionaron 50 muestras de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión, las cuales se encontraban congeladas a -20° C. Se ha reportado en la literatura que el almacenamiento, congelación y descongelación de la leche materna no degrada los miRNAs, un hallazgo dietéticamente importante para los

bebés de bajo peso al nacer y otros bebés hospitalizados a los que generalmente se les da leche materna almacenada en el congelador (Kosaka *et al.*, 2010).

En varios artículos se han encontrado miRNAs inmunorregulatorios, hasta ahora, se han descrito 59 miRNAs relacionados con el sistema inmune en los exosomas de la leche humana (Zhou *et al.*, 2011). En este trabajo se seleccionaron 5 miRNAs destacados por encontrarse en el top de los miRNAs más abundantes en la leche materna y por su papel en el desarrollo inmune, en la Tabla 8 se muestran los miRNAs seleccionados y su secuencia.

El miR-148a-3p se eligió en este trabajo porque se ha reportado con una alta abundancia en la leche materna (Chen *et al.*, 2010; Golan-Gerstl *et al.*, 2017; Herwijnen *et al.*, 2018; Simpson *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2011) y funciona como un importante regulador de la tolerancia y la autoinmunidad de las células B (Gonzalez-Martin *et al.*, 2016). Además, participa en la activación de la vía de señalización Notch para promover la diferenciación de monocitos en macrófagos. Los macrófagos que sobre-expresan miR-148a-3p exhibieron una capacidad mejorada para engullir y matar bacterias, que fue mediada por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Huang *et al.*, 2017).

El miR-181a es un regulador clave en el desarrollo, activación y diferenciación de células T, interviene en la activación del receptor de células T (TCR) en la selección tímica, así como las respuestas de células T periféricas. Una disminución en la expresión de miR-181a, debido a la transcripción reducida de pre-miR-181a, genera defectos en la activación de las células T (Sun *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2018). Éste miRNA se encuentra altamente expresado en la leche materna, Kosaka *et al.*, (2010) estimaron que un lactante recibe aproximadamente 1.3×10^7 copias/litro/día de miR-181a, siendo más abundante en el calostro que en la leche madura (Chen *et al.*, 2010; Kosaka *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2017) por lo que también se eligió para estudiarse en este trabajo.

El miR-146b-5p también se seleccionó debido a que desempeña un papel crítico en la regulación de la proliferación de células inmunes e inhibiendo las respuestas inflamatorias (Lee *et al.*, 2016). Se ha visto que la expresión del miR-146b aumenta notablemente durante la diferenciación de las células dendríticas.

Además modula la producción de citocinas proinflamatorias en las células dendríticas maduras (Park *et al.*, 2015; Testa *et al.*, 2017). Se ha encontrado dentro de los miRNAs más abundantes en la leche humana en diversos estudios (Alsaweed *et al.*, 2016b; Kosaka *et al.*, 2010; Munch *et al.*, 2013; Simpson *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2011).

Mientras que el miR-155-5p también se ha encontrado en altas concentraciones en la leche materna (Chen *et al.*, 2010; Kosaka *et al.*, 2010), este miRNA se ha relacionado con la diferenciación de las células T y B. En células B, el miR-155-5p regula positivamente la señalización mediada por anticuerpos. En un estudio se encontró que tanto el número de centros germinales como la producción de anticuerpos se reducen considerablemente en ratones con deficiencia de miR-155 (Mashima R., 2015). Este miRNA se encuentra en una mayor concentración en el calostro, y dado que las muestras de leche que tenemos en el presente estudio van de los 0 a los 6 días que corresponden a calostro y leche de transición, se podría obtener concentraciones altas del mismo.

Por último, el miRNA-200a-3p es importante en la activación del sistema inmune, su sobreexpresión está relacionada con la diferenciación de células T auxiliares, especialmente en células Th17. La diferenciación de células Th17 se ha relacionado con procesos inflamatorios. De esta manera, la sobreexpresión de miR-200a-3p contribuiría a la respuesta inflamatoria, lo que conduce a la producción de anticuerpos IgG en modelos murinos (Zárate-Neira *et al.*, 2017). Este miRNA también se encuentra en altas concentraciones en la leche materna (Herwijnen *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2017; Simpson *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2011) por lo que decidimos incluirlo en este estudio.

Se demostró mediante RT-PCR que los 5 miRNAs seleccionados se encuentran presentes en la leche materna (Figura 7). En esta figura se puede observar que los miRNAs miR-148a-3p, miR-181 a y miR-146b-5p se encuentran a una mayor concentración por la intensidad de la banda en el gel de agarosa, por otro lado, los miRNAs miR-200a-3p y el miR-155-5p se encuentran en menor concentración, sin embargo este sería un resultado preliminar, ya que se tiene que confirmar por la PCR en tiempo real y los análisis estadísticos.

A pesar de que se amplificaron los miRNAs seleccionados en la leche materna nos preguntamos si los primers en stem-loop se están uniendo a otros blancos o si son específicos a la secuencia del miRNA seleccionado, por lo que se secuenciaron los productos de la RT-PCR de cada uno de los miRNAs. Los miRNAs son muy pequeños para secuenciarlos solos, por lo que se ligaron y clonaron en el vector pJET1.2/blunt. De la figura 11 a la 15 se puede observar la secuenciación de los 5 miRNAs, se realizó un alineamiento con la secuencia reportada en la miRBase 22.1, dándonos un 100% de homología en cada uno de los miRNAs seleccionados, por lo que podemos asegurar que estos se encuentran presentes en la leche humana.

En la figura 17 se observan los resultados esperados de los niveles de expresión relativa de los 5 miRNAs inmunorregulatorios. Se espera que los miRNAs en la leche materna tengan una mayor concentración que en la fórmula láctea. De acuerdo a lo observado por Golan-Gerstl *et al.* (2017), en el cual analizaron la expresión del miR-148 a-3p en leche humana y 3 fórmulas lácteas, encontrando que este miRNA se encontraba a una menor expresión en los sucedáneos.

Debido a su estabilidad, los miRNAs pueden sobrevivir en gran medida a los procedimientos de preparación industrial de la leche; sin embargo, las fracciones de lípidos y células de la leche suelen descartarse en la fórmula láctea (Alsaweed *et al.*, 2015) por lo que la presencia de miRNAs en las fórmulas se reduce significativamente. De esta manera, se espera que los 5 miRNAs inmunorregulatorios seleccionados estén presentes en la fórmula láctea en menor concentración que en las muestras de leche materna. Entre ellos, el miR-148a-3p se espera que se encuentre en la fórmula láctea debido a que se ha encontrado en concentraciones altas en la leche de vaca (Golan-Gerstl *et al.*, 2017) y las fórmulas lácteas utilizadas en este proyecto están elaboradas a partir de leche de vaca. También se ha encontrado el miR-148a-3p en leche de cabra, de cerdo y de panda (Herwijnen *et al.*, 2018), demostrando que este miRNA se ha conservado en los mamíferos a lo largo de la evolución (Golan-Gerstl *et al.*, 2017).

XIII. Conclusión

- En este trabajo se pudo comprobar que la leche materna de madres mexicanas contiene miRNAs inmunorregulatorios como los son los miRNAs miR-148, miR-155, miR-181, miR-200 y miR-146. Además, se validó la secuencia de los miRNAs seleccionados en la leche humana en el vector pJET1.2/blunt.
- Si se validara la hipótesis de trabajo “La leche materna mexicana presenta una mayor concentración de miRNAs inmunorregulatorios en comparación a la fórmula láctea.” Se concluiría que los miRNAs inmunorregulatorios se encontrarían en una concentración alta en un momento inicial del desarrollo del neonato, cuando se requiere definir el control de diversas respuestas del organismo. Así mismo se demostraría que existen miRNAs en mayor concentración en la leche materna que en la fórmula láctea.

XIV. Bibliografía

- Alsaweed, M., Hartmann, P. E., Geddes, D. T., & Kakulas, F. (2015). Micrnas in breastmilk and the lactating breast: Potential immunoprotectors and developmental regulators for the infant and the mother. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 12, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/ijerph121113981>
- Alsaweed, M., Hepworth, A. R., Lefèvre, C., Hartmann, P. E., Geddes, D. T., & Hassiotou, F. (2015). Human Milk MicroRNA and Total RNA Differ Depending on Milk Fractionation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(10), 2397–2407. <https://doi.org/10.1002/jcb.25207>
- Alsaweed, M., Lai, C. T., Hartmann, P. E., Geddes, D. T., & Kakulas, F. (2016a). Human milk cells contain numerous miRNAs that may change with milk removal and regulate multiple physiological processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060956>
- Alsaweed, M., Lai, C. T., Hartmann, P. E., Geddes, D. T., & Kakulas, F. (2016b). Human milk miRNAs primarily originate from the mammary gland resulting in unique miRNA profiles of

- fractionated milk. *Scientific Reports*, 6(February), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep20680>
- Aly, E., Ali Darwish, A., Lopez-Nicolas, R., Frontela-Saseta, C., & Ros-Berruazo, G. (2018). Bioactive Components of Human Milk: Similarities and Differences between Human Milk and Infant Formula. In *Selected Topics in Breastfeeding*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73074>
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., ... Wang, J. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 690–703. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49–74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>. Human
- Benmoussa, A., & Provost, P. (2019). Milk MicroRNAs in Health and Disease. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(3), 703–722. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12424>
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J., & Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20), 1–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>
- Chen, X., Gao, C., Li, H., Huang, L., Sun, Q., Dong, Y., Tian, C., Gao, S., Dong, H., Guan, D., Hu, X., Zhao, S., Li, L., Zhu, L., Yan, Q., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2010). Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Research*, 20(10), 1128–1137. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.80>
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C.-Y. (2012). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends in Cell Biology*, 22(3), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.12.001>
- Collado, M. C., Delgado, S., Maldonado, A., & Rodríguez, J. M. (2009). Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 48(5), 523–528. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02567.x>
- Corona-Cervantes, K., García-González, I., Villalobos-Flores, L. E., Hernández-Quiroz, F., Piña-

- Escobedo, A., Hoyo-Vadillo, C., Rangel-Calvillo, M. N., & García-Mena, J. (2020). Human milk microbiota associated with early colonization of the neonatal gut in Mexican newborns. *PeerJ*, *8*, e9205. <https://doi.org/10.7717/peerj.9205>
- Dall, S. R. X., & Boyd, I. L. (2004). Evolution of mammals: lactation helps mothers to cope with unreliable food supplies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *271*(1552), 2049–2057. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2830>
- Dewey, K. G., & Brown, K. H. (2003). Update on Technical issues concerning Complementary Feeding of Young Children in Developing Countries and Implications for Intervention Programs. *Food and Nutrition Bulletin*, *24*(1), 5–28. <https://doi.org/10.1177/156482650302400102>
- Djuranovic, S., Nahvi, A., & Green, R. (2012). miRNA-Mediated Gene Silencing by Translational Repression Followed by mRNA Deadenylation and Decay. *Science*, *336*(6078), 237–240. <https://doi.org/10.1126/science.1215691>
- Eidelman, A. I., & Schanler, R. J. (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, *129*(3). <https://doi.org/10.1542/peds.2011-3552>
- ENSANUT. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. Presentación de resultados* (INEGI & INSP (eds.)). https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
- Figuroa-Lozano, S., & de Vos, P. (2019). Relationship Between Oligosaccharides and Glycoconjugates Content in Human Milk and the Development of the Gut Barrier. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(1), 121–139. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12400>
- Fujita, M., Baba, R., Shimamoto, M., Sakuma, Y., & Fujimoto, S. (2007). Molecular morphology of the digestive tract; macromolecules and food allergens are transferred intact across the intestinal absorptive cells during the neonatal-suckling period. *Medical Molecular Morphology*, *40*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00795-006-0346-3>
- Golan-Gerstl, R., Elbaum Shiff, Y., Moshayoff, V., Schechter, D., Leshkowitz, D., & Reif, S. (2017). Characterization and biological function of milk-derived miRNAs. *Molecular Nutrition and Food Research*, *61*(10), 1–26. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700009>
- Gomez-Gallego, C., Garcia-Mantrana, I., Salminen, S., & Collado, M. C. (2016). The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, *21*(6), 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2016.05.003>

- Gonzalez-Martin, A., Adams, B. D., Lai, M., Shepherd, J., Salvador-Bernaldez, M., Salvador, J. M., Lu, J., Nemazee, D., & Xiao, C. (2016). The microRNA miR-148a functions as a critical regulator of B cell tolerance and autoimmunity. *Nature Immunology*, *17*(4), 433–440. <https://doi.org/10.1038/ni.3385>
- Guo, M. (2014). Chemical composition of human milk. In *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857099150.1.19>
- Hassiotou, F., Geddes, D. T., & Hartmann, P. E. (2013). Cells in human milk: State of the science. *Journal of Human Lactation*, *29*(2), 171–182. <https://doi.org/10.1177/0890334413477242>
- Hassiotou, F., Hepworth, A. R., Metzger, P., Tat Lai, C., Trengove, N., Hartmann, P. E., & Filgueira, L. (2013). Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clinical & Translational Immunology*, *2*(4), e3. <https://doi.org/10.1038/cti.2013.1>
- Heegaard, N. H. H., Schetter, A. J., Welsh, J. A., Yoneda, M., Bowman, E. D., & Harris, C. C. (2012). Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, *130*(6), 1378–1386. <https://doi.org/10.1002/ijc.26153>
- Herwijnen, M. J. C. va., Driedonks, T. A. P., Snoek, B. L., Kroon, A. M. T., Kleinjan, M., Jorritsma, R., Pieterse, C. M. J., Hoen, E. N. M. N. ð., & Wauben, M. H. M. (2018). Abundantly Present miRNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles Are Conserved Between Mammals. *Frontiers in Nutrition*, *5*(September), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00081>
- Huang, F., Zhao, J.-L., Wang, L., Gao, C.-C., Liang, S.-Q., An, D.-J., Bai, J., Chen, Y., Han, H., & Qin, H.-Y. (2017). miR-148a-3p Mediates Notch Signaling to Promote the Differentiation and M1 Activation of Macrophages. *Frontiers in Immunology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01327>
- INEGI. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 (ENSANUT)*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ensanut/2018/doc/ensanut_2018_diseno_conceptual.pdf
- Karlsson, O., Rodosthenous, R. S., Jara, C., Brennan, K. J., Wright, R. O., Baccarelli, A. A., & Wright, R. J. (2016). Detection of long non-coding RNAs in human breastmilk extracellular vesicles: Implications for early child development. *Epigenetics*, *11*(10), 721–729. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1216285>
- Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K., & Ochiya, T. (2010). MicroRNA as a new immune-regulatory

- agent in breast milk. *Silence*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1758-907X-1-7>
- Kramer, M. F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology*, SUPPL. 95, 1–15. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1510s95>
- Lässer, C., Seyed Alikhani, V., Ekström, K., Eldh, M., Torregrosa Paredes, P., Bossios, A., Sjöstrand, M., Gabrielsson, S., Lötvall, J., & Valadi, H. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of Translational Medicine*, 9(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-9>
- Lee, H.-M., Kim, T. S., & Jo, E.-K. (2016). MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Reports*, 49(6), 311–318. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.6.056>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Liao, Y., Du, X., Li, J., & Lönnedal, B. (2017). Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(11), 1–32. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700082>
- Lindsay, M. A. (2008). microRNAs and the immune response. *Trends in Immunology*, 29(7), 343–351. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.04.004>
- Martin, C. R., Ling, P. R., & Blackburn, G. L. (2016). Review of infant feeding: Key features of breast milk and infant formula. *Nutrients*, 8(5), 1–11. <https://doi.org/10.3390/nu8050279>
- Mashima, R. (2015). Physiological roles of miR-155. *Immunology*, 145(3), 323–333. <https://doi.org/10.1111/imm.12468>
- Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), 1907–1920. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>
- Munch, E. M., Harris, R. A., Mohammad, M., Benham, A. L., Pejerrey, S. M., Showalter, L., Hu, M., Shope, C. D., Maningat, P. D., Gunaratne, P. H., Haymond, M., & Aagaard, K. (2013). Transcriptome Profiling of microRNA by Next-Gen Deep Sequencing Reveals Known and Novel miRNA Species in the Lipid Fraction of Human Breast Milk. *PLoS ONE*, 8(2), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050564>
- Neville, M. C., Allen, J. C., & Watters, C. (1983). The Mechanisms of Milk Secretion. In *Lactation* (pp. 49–102). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3688-4_3

- O'Sullivan, A., Farver, M., & Smilowitz, J. T. (2015). Article Commentary: The Influence of Early Infant-Feeding Practices on the Intestinal Microbiome and Body Composition in Infants. *Nutrition and Metabolic Insights*, *8s1*, NMI.S29530. <https://doi.org/10.4137/NMI.S29530>
- OMS, & UNICEF. (2003). *Estrategia Mundial para la Alimentación del Lactante y del Niño Pequeño*. La Organización Mundial de la Salud. https://www.who.int/nutrition/publications/gi_infant_feeding_text_spa.pdf
- Pablón-Martínez, V. Y. (2011). MicroARNs una visión molecular MicroRNA (miRNA) A molecular view. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, *43*(3), 289–297.
- Pareja, E. (2018). *¿Cómo es la leche producida por los mamíferos?* Quora. <https://es.quora.com/Cómo-es-la-leche-producida-por-los-mamíferos>
- Park, H., Huang, X., Lu, C., Cairo, M. S., & Zhou, X. (2015). MicroRNA-146a and MicroRNA-146b Regulate Human Dendritic Cell Apoptosis and Cytokine Production by Targeting TRAF6 and IRAK1 Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(5), 2831–2841. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.591420>
- Picciano, M. F. (2001). Nutrient Composition of Human Milk. *Pediatric Clinics of North America*, *48*(1), 53–67. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(05\)70285-6](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(05)70285-6)
- Rani, P., Yenuganti, V. R., Shandilya, S., Onteru, S. K., & Singh, D. (2017). miRNAs: The hidden bioactive component of milk. *Trends in Food Science and Technology*, *65*, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.007>
- Rawlings-Goss, R. A., Campbell, M. C., & Tishkoff, S. A. (2014). Global population-specific variation in miRNA associated with cancer risk and clinical biomarkers. *BMC Medical Genomics*, *7*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-53>
- Rezaei, R., Wu, Z., Hou, Y., Bazer, F. W., & Wu, G. (2016). Amino acids and mammary gland development: Nutritional implications for milk production and neonatal growth. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *7*(1). <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0078-8>
- Siigur, U., Ormisson, A., & Tamm, A. (1993). Faecal short-chain fatty acids in breast-fed and bottle-fed infants. *Acta Paediatrica*, *82*(6–7), 536–538. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1993.tb12747.x>
- Simpson, M. R., Brede, G., Johansen, J., Johnsen, R., Storrø, O., Sætrum, P., & Øien, T. (2015). Human breast milk miRNA, maternal probiotic supplementation and atopic dermatitis in offspring. *PLoS ONE*, *10*(12), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143496>
- Sun, Q., Chen, X., Yu, J., Zen, K., Zhang, C.-Y., & Li, L. (2013). Immune modulatory function of

- abundant immune-related microRNAs in microvesicles from bovine colostrum. *Protein & Cell*, 4(3), 197–210. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-2119-9>
- Testa, U., Pelosi, E., Castelli, G., & Labbaye, C. (2017). miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Non-Coding RNA*, 3(3), 22. <https://doi.org/10.3390/ncrna3030022>
- Tomé-Carneiro, J., Fernández-Alonso, N., Tomás-Zapico, C., Visioli, F., Iglesias-Gutierrez, E., & Dávalos, A. (2018). Breast milk microRNAs harsh journey towards potential effects in infant development and maturation. Lipid encapsulation can help. *Pharmacological Research*, 132(February), 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.04.003>
- UNICEF. (2018). *Informe Anual: México 2018*. <https://unicef.org.mx/Informe2018/Informe-Anual-2018.pdf>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- van der Grein, S. G., & Hoen, E. N. M. (2014). “Small Talk” in the Innate Immune System via RNA-Containing Extracellular Vesicles. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00542>
- van Niel, G., D’Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Walker, A. (2010). Breast Milk as the Gold Standard for Protective Nutrients. *The Journal of Pediatrics*, 156(2), S3–S7. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.021>
- Wang, Z., & Yang, B. (2010). End-Point Stem-Loop Real-Time RT-PCR for miRNA Quantification. In *MicroRNA Expression Detection Methods* (pp. 131–140). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-04928-6_5
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733–1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855–862. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4)
- Witkowska-Zimny, M., & Kaminska-El-Hassan, E. (2017). Cells of human breast milk. *Cellular and*

- Molecular Biology Letters*, 22(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s11658-017-0042-4>
- Witwer, K. W., & Hirschi, K. D. (2014). Transfer and functional consequences of dietary microRNAs in vertebrates: Concepts in search of corroboration. *BioEssays*, 36(4), 394–406. <https://doi.org/10.1002/bies.201300150>
- Xi, Y., Jiang, X., Li, R., Chen, M., Song, W., & Li, X. (2016). The levels of human milk microRNAs and their association with maternal weight characteristics. *European Journal of Clinical Nutrition*, 70(4), 445–449. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.168>
- Ye, Z., Li, G., Kim, C., Hu, B., Jadhav, R. R., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2018). Regulation of miR-181a expression in T cell aging. *Nature Communications*, 9(1), 3060. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05552-3>
- Zárate-Neira, L. Á., Sánchez-Barbosa, S., Pedroza-Torres, A., Reséndiz-Mora, A., Wong, C., Baeza, I., Pérez-Plasencia, C., & Wong-Baeza, C. (2017). Dysregulation of miR-155-5p and miR-200-3p and the Anti-Non-Bilayer Phospholipid Arrangement Antibodies Favor the Development of Lupus in Three Novel Murine Lupus Models. *Journal of Immunology Research*, 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/8751642>
- Zhou, Q., Li, M., Wang, X., Li, Q., Wang, T., Zhu, Q., Zhou, X., Wang, X., Gao, X., & Li, X. (2011). Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *International Journal of Biological Sciences*, 8(1), 118–123. <https://doi.org/10.7150/ijbs.8.118>

XV. Anexos

Anexo 1. Declaración

PROYECTO MEDICIÓN DE MICROBIOTA DE LECHE HUMANA SIN PASTEURIZAR Y POSTERIOR A PASTEURIZACIÓN. PIC-217B560002018006

Investigador Principal: DR. ARTURO GIL GUTIÉRREZ PONCE.

Le estamos invitando a participar en un estudio que es realizado por el Hospital General “Dr. José María Rodríguez”, Ecatepec de Morelos, Estado de México, México y el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco. El objetivo es caracterizar la microbiota de la leche materna y del muestras fecales del neonato y determinar si existen diferencias significativas en la diversidad de los microorganismos. En este estudio no se le realizará ningún tratamiento médico ni nutricional. Si usted acepta participar le solicitaremos nos pueda proporcionar una muestra de leche materna y material fecal del neonato, para esta última se le proporcionará un kit de recolección. Este estudio nos permitirá conocer el desarrollo de una microbiota bacteriana saludable en el tracto digestivo. La participación es absolutamente voluntaria.

PROCEDIMIENTOS DEL PROTOCOLO DE ESTUDIO

Si usted acepta participar se le hará una revisión médica luego del parto en el hospital y se tomarán las muestras. Las muestras se transportarán hasta las instalaciones del Laboratorio de Referencia y Apoyo para Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco, en donde serán procesadas para la determinación de la diversidad de la microbiota bacteriana usando secuenciación de nueva generación.

RESPONSABILIDADES DEL PACIENTE

Al aceptar participar en el estudio, se compromete a lo siguiente:

1. Brindar las muestras requeridas en las fechas proporcionadas al inicio del estudio.
2. Permitir que sus muestras sean procesadas en Laboratorio de Referencia y Apoyo para Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco.

Si su muestra no se encuentra en condiciones necesarias para realizar las pruebas para este estudio o si usted retira su consentimiento, se finalizará su participación en el mismo.

RIESGOS Y MALESTAR ESPERABLES

Al participar en este estudio NO TIENE NINGÚN RIESGO. Su participación no interferirá en su estilo de vida ni costumbres.

BENEFICIOS

El beneficio personal que obtendrá será el conocer la diversidad de los microorganismos en su leche materna y los que habitan su colon del neonato.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

Usted no recibirá ningún pago por donar sus muestras, entendemos esto como un regalo de su parte a la investigación. Las muestras se utilizarán exclusivamente para los fines de investigación. Asimismo, los estudios que se le realicen serán completamente gratuitos.

CONFIDENCIALIDAD

En ningún momento se conocerá su nombre, ya que a las muestras se les asignará una clave. LA INFORMACIÓN QUE SE OBTENGA DE LAS MUESTRAS SERÁ ESTRICTAMENTE CONFIDENCIAL.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA Y RETIRO DEL CONSENTIMIENTO

Usted es libre de escoger donar o no sus muestras, la donación es voluntaria. En caso de que después de haber aceptado la donación cambie de opinión, la muestra se destruirá. En caso de haber realizado alguna investigación y si existen resultados sobre la muestra antes de que haya cambiado de opinión, estos datos sí serán utilizados.

PREGUNTAS

Es posible que existan palabras técnicas que no entiende en este documento. Por favor pregunte todo lo que no entiende y tome su tiempo para decidir hacer la donación de las muestras.

Si antes o durante su participación en este estudio, usted tiene alguna pregunta puede contactar al Dr. Jaime García Mena al 5747 3800 Ext. 5327, correo electrónico: jgmena@cinvestav.mx del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco o al Dr. Martín Noé Rangel Calvillo.

CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación PROYECTO MEDICIÓN DE MICROBIOTA DE LECHE HUMANA SIN PASTEURIZAR Y POSTERIOR A PASTEURIZACIÓN. Investigador Principal: DR. ARTURO GIL GUTIÉRREZ PONCE. El propósito de esta investigación es conocer la diversidad de la microbiota bacteriana de mi leche materna y del tracto digestivo de mi neonato. Se me ha explicado que mi participación consistirá en: Autorizar el uso de una muestra de leche 5 mL y de copro, para obtener DNA, que habrá de congelarse. Declaro que se me han informado los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio y que son los siguientes: La molestia de donar una muestra de leche y copro de mi neonato. El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento; así como responder a cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán al cabo, los riesgos y beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento además de informarme los resultados de la investigación. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que con ello afecte la atención médica que recibo del instituto. El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven del estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esto pudiera hacerme cambiar de opinión respecto de mi permanencia en el estudio. Al firmar este documento, doy permiso para usar mis muestras para los fines que el documento describe. Al firmar este documento no renuncio a ninguno de mis derechos legales.

Declaro que no haré responsable al investigador, al proyecto, al Hospital General “Dr. José María Rodríguez”, Ecatepec de Morelos, Estado de México, México y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco por algún accidente o problema en mi salud durante y después de mi participación en este proyecto.

Nombre completo del paciente:

Correo electrónico _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Firma: _____

Nombre completo del Testigo 2:

Correo electrónico _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Firma: _____

Nombre completo del Testigo 1:

Correo electrónico _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Firma: _____

Nombre completo del investigador:

Correo electrónico _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Firma: _____

Anexo 2. Datos completos de las mujeres participantes en el estudio.

Folio	Toma de muestra	Origen	Estudios	Ocupación	Edad	Estatura	Peso AE	IMC AE	Paridad	Antib	Tabaco	Madurez
L23	2	Estado de México	Preparatoria	Ama de casa	23	1.53	55	23.50	Múltipara	No	No	A termino
L25	1	Ciudad de México	Preparatoria	Ama de casa	28	1.58	74	29.64	Múltipara	No	No	A termino
L34	2	Estado de México	Preparatoria	Ama de casa	33	1.55	71	29.55	Múltipara	No	No	A termino
L65	1	Estado de México	Primaria	Ama de casa	18	1.66	63	22.86	Primípara	No	No	A termino
L70	1	Estado de México	Secundaria	Ama de casa	17	1.6	70	27.34	Múltipara	No	No	A termino
L75	2	Estado de México	Preparatoria	Empleada	32	1.54	50	21.08	Múltipara	No	No	A termino
L90	1	Estado de México	Preparatoria	Estudiante	17	1.56	56	23.01	Primípara	No	No	A termino
L91	1	Hidalgo	Primaria	Ama de casa	20	1.55	56	23.31	Múltipara	No	No	A termino
L101	2	Estado de México	Preparatoria	Ama de casa	27	1.5	52	23.11	Múltipara	No	No	A termino
LF105	1	Ciudad de México	Secundaria	Ama de casa	23	1.58	70	28.04	Múltipara	No	No	A termino
LF106	1	Ciudad de México	Primaria	Ama de casa	28	1.57	63	25.56	Múltipara	No	No	A termino
LF108	1	Ciudad de México	Secundaria	Ama de casa	21	1.7	55	19.03	Múltipara	No	No	A termino
LF109	1	Estado de México	Preparatoria	Ama de casa	23	1.59	68	26.90	Múltipara	No	No	A termino
LF119	1	Ciudad de México	Preparatoria	Ama de casa	22	1.46	47	22.05	Múltipara	No	No	A termino
LF122	1	Ciudad de México	Secundaria	Ama de casa	32	1.69	70	24.51	Múltipara	No	No	A termino
LF128	1	Estado de México	Preparatoria	Ama de casa	23	1.55	51	21.23	Múltipara	No	No	A termino
LF129	2	Estado de México	Preparatoria	Ama de casa	21	1.6	54	21.09	Múltipara	No	No	A termino
LF133	1	Estado de México	Secundaria	Ama de casa	25	1.45	43	20.45	Múltipara	No	No	A termino
LF142	2	Estado de México	Preparatoria	Ama de casa	22	1.49	47	21.17	Múltipara	No	No	A termino
LF143	2	Puebla	Preparatoria	Ama de casa	25	1.52	52	22.51	Múltipara	No	No	A termino
LF156	1	Estado de México	Secundaria	Ama de casa	19	1.59	58	22.94	Múltipara	No	No	A termino
LF170	1	Estado de México	Primaria	Ama de casa	26	1.54	64	26.99	Múltipara	No	No	A termino
LF185	1	Ciudad de México	Primaria	Ama de casa	22	1.53	50	21.36	Múltipara	No	No	A termino
LF187	0	Estado de México	Universitaria	Estudiante	23	1.48	54	24.65	Múltipara	No	No	A termino
LF250	1	Oaxaca	Preparatoria	Ama de casa	25	1.58	56	22.43	Múltipara	No	No	A termino

LF252	1	Estado de México	Secundaria	Ama de casa	24	1.62	74	28.20	Múltipara	No	No	A termino
LF253	2	Hidalgo	Primaria	Ama de casa	15	1.5	50	22.22	Primípara	No	No	A termino
LF256	1	Ciudad de México	Preparatoria	Ama de casa	20	1.54	70	29.52	Primípara	No	No	A termino
LF261	1	Ciudad de México	Secundaria	Ama de casa	18	1.72	67	22.65	Múltipara	No	No	A termino
LF263	1	Estado de México	Preparatoria	Empleada	19	1.6	54	21.09	Múltipara	No	No	A termino
LF265	1	Ciudad de México	Preparatoria	Ama de casa	36	1.55	58	24.14	Múltipara	No	No	A termino
LF267	1	Oaxaca	Primaria	Ama de casa	16	1.53	50	21.36	Múltipara	No	No	A termino

-fin-de-texto-