

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Reconocimiento de las bacterias del calostro humano por las
subclases de IgA y su efecto en la composición de la microbiota
fecal en el recién nacido”**

T E S I S

Que presenta

M en C. ERICK SAÚL SÁNCHEZ SALGUERO

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de tesis:

DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO

DR. JAIME GARCÍA MENA

Ciudad de México

noviembre, 2021

TUTORES

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Investigador titular y jefe del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN Zacatenco, Ciudad de México.

Dr. Jaime García Mena

Investigador titular del Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN Zacatenco, Ciudad de México.

ASESORES

Dra. Rosaura Hernández Rivas

Investigadora titular del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN Zacatenco, Ciudad de México.

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Investigador titular del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN Zacatenco, Ciudad de México.

Dr. Leticia Cedillo Barrón

Investigadora titular del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN Zacatenco, Ciudad de México.

Dr. Francisco Javier Torres López

Investigador titular y jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Ciudad de México.

AGRADECIMIENTOS AL CONACYT

Este trabajo se realizó en colaboración entre el Departamento de Biomedicina Molecular y el Departamento de Genética y Biología Molecular; del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV del I.P.N.), bajo la tutoría de los Dres. Leopoldo Santos Argumedo y Jaime García Mena. Durante el desarrollo de esta investigación, se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través de la beca de doctorado No. 706312, en el período 2017-2021.

Este proyecto contó con el apoyo económico del CONACyT, a través del financiamiento del proyecto PDCPN 2015/900: "Detección de inmunoglobulina A en calostro humano como tamizaje de deficiencia selectiva de IgA en madres y su correlación con infecciones (vías respiratorias y gastrointestinales) en el neonato durante el primer trimestre de vida", otorgado al Dr. Leopoldo Santos Argumedo.

OTROS APOYOS

Este proyecto contó con el apoyo económico del Fondo SEP-Cinvestav, No. 174: "Caracterización de la microbiota del calostro y leche humana por los subtipos de IgA y su relación con episodios infecciosos durante el embarazo", otorgado a los Doctores Jaime García Mena y Leopoldo Santos Argumedo.

DEDICATORIA

Para mi novia y esposa Alma Alonso Zúñiga que siempre me apoyaste en todo momento y por permitirme vivir la mejor experiencia de todas a tu lado. Gracias mi niña.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, al Dr. Leopoldo Santos Argumedo y Dr. Jaime García Mena, por permitirme trabajar en sus laboratorios; por su guía, sus consejos, sus conocimientos y críticas que promovieron la mejora de mi proyecto y formación académica. A mis asesores y guías, la Dra. Rosaura Hernández Rivas, el Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete, la Dra. Leticia Cedillo Barrón, el Dr. Javier Torres López y el Dr. Marco Antonio Vega López.

Al Dr. Víctor Contreras Vargas, a los MMCC Héctor Armando Guzmán Aquino, María Fernanda de la Borbolla Cruz y S. Lizette Gutiérrez Escamilla, por la recolección, toma, procesamiento de muestras y su apoyo en las técnicas de biología molecular.

A los Sres. Lenin Estudillo Díaz y Jesús Guzmán Campuzano por su apoyo técnico y amistad. A los integrantes del laboratorio 1 de Biomedicina Molecular: a los MM. en CC. Carlos (Carlitos), Francisco (Panchito), Diana Olgún (Dianita), Diana Berenice (Dian), Irving, Mizael (Miza) y David (Perrucho); a los DD. en CC. Zayda Piedra y Daniel Girón; por sus consejos, los momentos, las experiencias y, sobre todo, por su amistad.

Se agradecen las críticas y observaciones de todos los integrantes del laboratorio 0 de Genética y Biología Molecular; en especial al Biol. Alberto Piña Escobedo por su apoyo en la secuenciación semiconductora de iones Ion Torrent, a la M. en C. Karina Corona Cervantes (Kari) por su guía en las técnicas de Biología Molecular; a los MM. en CC. Fernando Hernández Quiroz y Loan Edel Villalobos por su apoyo en el análisis bioinformático de los datos. Finalmente, a la M. en C. Norma Gabriela Zavala Torres (Gaby) por sus críticas que enriquecieron este trabajo.

INDICE

Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	xi
Abreviaturas.....	x
Resumen.....	xi
Summary.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Inicio de la interacción hospedero-microbiota	1
1.2 Composición y funciones generales de la microbiota humana	2
1.3 Calostro y lactancia materna	4
1.4 Subtipos de IgA en el calostro	7
1.5 Microbiota en el calostro humano.....	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3. HIPÓTESIS.....	14
4. OBJETIVOS.....	14
4.1 Objetivo General	14
4.2 Objetivos particulares.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Diseño y tipo de estudio	15
5.2 Criterios de inclusión	15
5.3 Criterios de exclusión.....	15
5.4 Muestreo	16
5.5 Separación de las fases	17
5.7 Cuantificación de inmunoglobulinas.....	17
5.8 Separación de bacterias en fracciones IgA1+ e IgA2+	18
5.9 Extracción y purificación de ADN genómico	19
5.10 Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S rRNA	20
5.11 Secuenciación masiva semiconductor de iones por Ion Torrent	21
5.12 Análisis de los datos de secuenciación y métodos estadísticos	22
5.13 Análisis estadístico de la microbiota	22

5.14 Ensayo de degradación de la IgA1.....	24
5.15 Western blot de Serin hidroximetil transferasa (SHMT).....	25
6. RESULTADOS	26
6.1 Controles para descartar contaminantes ambientales en muestras de baja biomasa	26
6.2 Fracciones de bacterias decoradas con los subtipos de IgA.....	26
6.2 Construcción de genotecas para secuenciación por Ion Torrent.....	30
6.3 Composición de la microbiota en el calostro en las muestras de heces de los neonatos con base en la abundancia relativa.....	31
6.4 Diversidad alfa de la microbiota en calostro y muestras de heces.....	33
6.5 Diversidad beta de la microbiota en calostro y muestras de heces	35
6.6 Diferencias taxonómicas en la microbiota de calostro y muestras de heces con base en el análisis de discriminación lineal LEfSe	36
6.7 Análisis de la asociación de diversidad de la microbiota con las rutas metabólicas en muestras de calostro y heces por PICRUSt.....	38
8. CONCLUSIONES.....	52
9. PERSPECTIVAS	52
10. REFERENCIAS	53
11. ANEXOS	58
11.1 Cuestionario clínico del expediente de la madre	58
11.2 Consentimiento informado	61
11.3 Tabla 3. Listado de Barcodes	64
11.4 Publicaciones derivadas del proyecto de doctorado.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. La microbiota humana y su diversidad con respecto a la edad humana.

Figura 2. Subclases de IgA en el ser humano.

Figura 3. Relación de la IgA con la microbiota en el recién nacido.

Figura 4. Regiones del 16S rDNA.

Figura 5. Descripción general del análisis bioinformático.

Figura 6. Ausencia de bacterias contaminantes en los controles ambientales.

Figura 7. Niveles de las subclases de IgA en las muestras analizadas.

Figura 8. Análisis de Citometría en las fracciones de bacterias asociadas con las subclases de IgA.

Figura 9. Imágenes representativas de geles de agarosa.

Figura 10. Comparación de la abundancia relativa de la microbiota entre los grupos estudiados.

Figura 11. Distribución de las muestras analizadas según los índices de diversidad alfa.

Figura 12. Análisis de componentes principales (PCoA) presentes en las muestras analizadas.

Figura 13. Análisis de coordenadas principales (PCoA) presentes en las fracciones de calostro.

Figura 14. Comparación LEfSe.

Figura 15. Diferenciación entre taxones bacterianos.

Figura 16. Variación funcional de las vías metabólicas.

Figura 17. Análisis del reconocimiento de las subclases de IgA en calostro a la enzima SHMT.

Figura 18. Las proteasas bacterianas degradan preferentemente a la IgA1.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores y mezcla de reacción para la amplificación de la región V3 de gen 16S rRNA.

Tabla 2. Condiciones de la PCR para la amplificación de la región V3 del gen 16S rRNA.

Tabla 3. Listado de Barcodes (Anexos).

ABREVIATURAS

16S rRNA	Gen que codifica para el RNA ribosomal 16S RNA
APC	Aloficocianina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IgA1	inmunoglobulina A subclase 1
IgA2	inmunoglobulina A subclase 2
IgA	Inmunoglobulina A
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicio Social para los Trabajadores del Estado
LEfSe	Análisis discriminante lineal por efecto del tamaño; del inglés <i>Lineal discriminant effect size</i>
MALT	tejido linfoide asociado a mucosas; del inglés <i>Mucosal associated lymphoid tissue</i>
OTU	Unidad Taxonómica Operacional
QIIME	Conocimientos Cuantitativos en la Ecología Microbiana.
pIgR	receptor de inmunoglobulinas poliméricas
SIM	sistema inmunológico de las mucosas
UFC	Unidad Formadora de Colonias

RESUMEN

Al nacer, el neonato debe adaptarse a las nuevas condiciones del medio ambiente e interactuar con los antígenos del exterior. Para esto, requiere de los factores que la madre le provea vía transplacentaria, durante el embarazo, y a través de la lactancia, después del nacimiento. El calostro y la leche materna, además de ser fuentes de alimento, contienen factores que contribuyen a la defensa del recién nacido.

El calostro humano es una fuente de microbiota para el recién nacido. En condiciones homeostáticas, ciertos géneros bacterianos en el calostro están asociados con la inmunoglobulina A (IgA). Esta inmunoglobulina participa en la regulación de la composición de bacterias en el intestino. Los humanos tienen dos subclases de IgA: IgA1 e IgA2; las cuales, muestran variabilidad en su especificidad hacia géneros microbianos. Sin embargo, el reconocimiento de bacterias por estas subclases del calostro y su papel en el establecimiento de la microbiota en el recién nacido no se han estudiado.

En este trabajo describimos, mediante IgA-seq, la composición de la microbiota asociada con las subclases de IgA en calostro humano, meconio y heces de neonatos. Bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Clostridium* están decorados predominantemente por la IgA1, mientras que la IgA2 reconoce *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Bacteroidetes*. Estos géneros de bacterias, reconocidos por IgA2 en el calostro, son más abundantes en las heces de los recién nacidos. Nuestros resultados sugieren un reconocimiento preferencial por la IgA2 de las bacterias comensales presentes en el calostro, revelando una posible función de la IgA durante la colonización intestinal del neonato durante los primeros días de vida.

Por análisis bioinformático de predicción de metagenoma demostramos que una de las rutas metabólicas más importantes, entre las bacterias IgA2+ en las heces de los recién nacidos, es el ciclo del folato. La serin hidroximetil transferasa (SHMT) es una enzima esencial en esta ruta metabólica. Nuestros datos sugieren que la SHMT funcionaría como un antígeno común compartido por estas bacterias, regulando su capacidad de ser reconocidas por la subclase de IgA.

SUMMARY

At birth, the newborn must adapt to new environmental conditions and interact with antigens from outside. For this, it requires the factors that the mother provides transplacentally, during pregnancy, and through lactation, after birth. Colostrum and breast milk, in addition to being food sources, also contain factors that contribute to the defense of the newborn.

Human colostrum is a source of microbiota for the newborn. Under homeostatic conditions, certain bacterial genera in colostrum are associated with immunoglobulin A (IgA). This immunoglobulin participates in the regulation of the composition of bacteria in the intestine. Humans have two subclasses of IgA: IgA1 and IgA2; which show variability in its specificity towards microbial genera. However, the recognition of bacteria by these subclasses of colostrum and their role in establishing the microbiota in the newborn have not been studied.

In this work, we describe, using IgA-seq, the composition of the microbiota associated with IgA subclasses in human colostrum, meconium and neonatal feces. Bacteria of the genera *Streptococcus*, *Staphylococcus*, and *Clostridium* are predominantly decorated by IgA1, while IgA2 recognizes bacteria of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Bacteroidetes*. These genera of bacteria, recognized by IgA2 in colostrum, are more abundant in the feces of newborns. Our results suggest that IgA2 plays an essential role during colonization of the microbiota in the infant, granting an advantage during colonization of the intestine.

Predictive metagenomics analysis demonstrate that one of the most important metabolic pathways, among bacteria associated with IgA in the feces of newborns, is the folate cycle. Serin hydroxymethyl transferase (SHMT) is an essential enzyme in this metabolic pathway. Our data suggests that SHMT would function as a common antigen shared by IgA2 + bacteria, regulating its ability to be recognized by the IgA subclass.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Inicio de la interacción hospedero-microbiota

El cuerpo humano está formado, en promedio, por unas 10^{14} células propias. De acuerdo con estimaciones previas, esta cantidad podría representar desde el 10 hasta el 50 % (Sender y col., 2016) de la composición total; mientras que el resto correspondería a células de origen microbiano.

Mientras que el concepto de microbiota se entiende como el conjunto de las especies microbianas que se localizan en las diferentes partes del cuerpo, estableciendo redes de interacción complejas con individuos de su misma especie, con bacterias de otras especies y con células del propio hospedero (Nagpal y col., 2018). El microbioma es la información genética o genomas completos de la microbiota (Nagpal y col., 2018).

Sin embargo, es hasta el momento del nacimiento que el neonato comienza a interactuar, de forma activa, con una importante cantidad de microorganismos del medio exterior. Estos microorganismos son capaces de establecerse en las barreras epiteliales del neonato dentro de los primeros minutos de vida (Korpela & de Vos, 2018). Al conjunto de estos microorganismos se le conoce como “la primera microbiota neonatal” y su composición filogenética depende, en primera instancia, de la vía de nacimiento (von Mutius, 2017):

A través del parto natural, las bacterias que se establecen en el bebé, provienen del canal vaginal materno y área perianal. Esta composición comprende a las bacterias Gram positivas, anaerobias, aerotolerantes, fermentadoras de lactato del género *Lactobacillus*; y por las bacterias Gram negativas anaerobias facultativas, no esporuladas, sacarolíticas y probióticas de los géneros *Prevotella*, *Serratia*, *Bifidobacterium*; y a la familia de las *Enterobacterias* del filo *Proteobacteria*; y algunas especies del filo *Bacteroidetes* (von Mutius, 2017).

Mediante el parto por vía cesárea, los epitelios del bebé son ocupados por las bacterias propias de la piel y la mucosa oral de la madre. Estas bacterias son Gram positivas, en forma de cocos o bacilos, anaerobias facultativas o

anaerobias estrictas; que pertenecen a los géneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* (von Mutius, 2017).

Conforme el recién nacido crece, comienza a interactuar más activamente con el ambiente exterior y con otras personas ajenas a la madre. Esto permite que la diversidad y la cantidad de los microorganismos comensales aumenten de forma gradual, fomentando un desarrollo adecuado de la respuesta inmunológica y la homeostasis en los epitelios del neonato (Urbaniak y col., 2012). Este cambio en la diversidad y la cantidad de los microorganismos se mantiene durante los dos primeros años de vida, se modifica durante la edad escolar y se incrementa, nuevamente, a partir de la pubertad hasta la edad adulta (Nagpal y col., 2018).

1.2 Composición y funciones generales de la microbiota humana

Aunque la microbiota humana está conformada por organismos de todos los reinos taxonómicos, por proporción e importancia clínica, la microbiota bacteriana ha sido la más estudiada (Selma-Royo, 2019). Las bacterias son microorganismos unicelulares, quimioheterótrofos, aerobios o anaerobios en su mayoría, de entre 0.5 μm a 5 μm de longitud, en forma de filamentos, cocos, bacilos, vibrios o espirilos, que pertenecen al reino Procarionte.

La principal fila bacteriana, propios de la microbiota humana, se pueden organizar en tres conjuntos: el de los Termófilos (bacterias extremófilas y de vida libre), el de los Gram positivos (que comprende a la fila *Firmicutes* y *Actinobacteria*) y el de Gracilicutes (que contiene a la fila Gram negativos *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Fusobacteria*) (von Mutius, 2017).

La composición filogenética de la microbiota se modifica durante toda la vida. Esta variación depende de características propias del hospedero como: la edad, el género, el peso corporal, la raza, la dieta, el uso de ciertos tipos de fármacos, la actividad física, la ocupación laboral, la interacción con animales o mascotas, la presencia de enfermedades infecciosas y por estados fisiológicos específicos, como el embarazo (Selma-Royo y col., 2019).

Sin embargo, una porción de la microbiota puede mantenerse constante a lo largo del tiempo, debido a su gran capacidad de adaptación a las diferentes

condiciones fisiológicas y fisicoquímicas de cada una de las barreras epiteliales. Estos géneros conforman el llamado “núcleo del nicho ecológico” y su composición filogenética es característica de cada sitio anatómico (Wang S y col., 2020):

Los géneros bacterianos secundarios son aquellos que pueden formar parte del núcleo del nicho ecológico, pero su composición filogenética es más variable a lo largo del tiempo, ya que no poseen una capacidad de adaptación tan eficiente. Estos géneros bacterianos pueden aprovechar la actividad metabólica de las bacterias del nicho ecológico o adquirir los genes relacionados con cierta capacidad adaptativa, a través de los mecanismos de transferencia horizontal, como la transformación, la transducción y la conjugación (Wang y col., 2020).

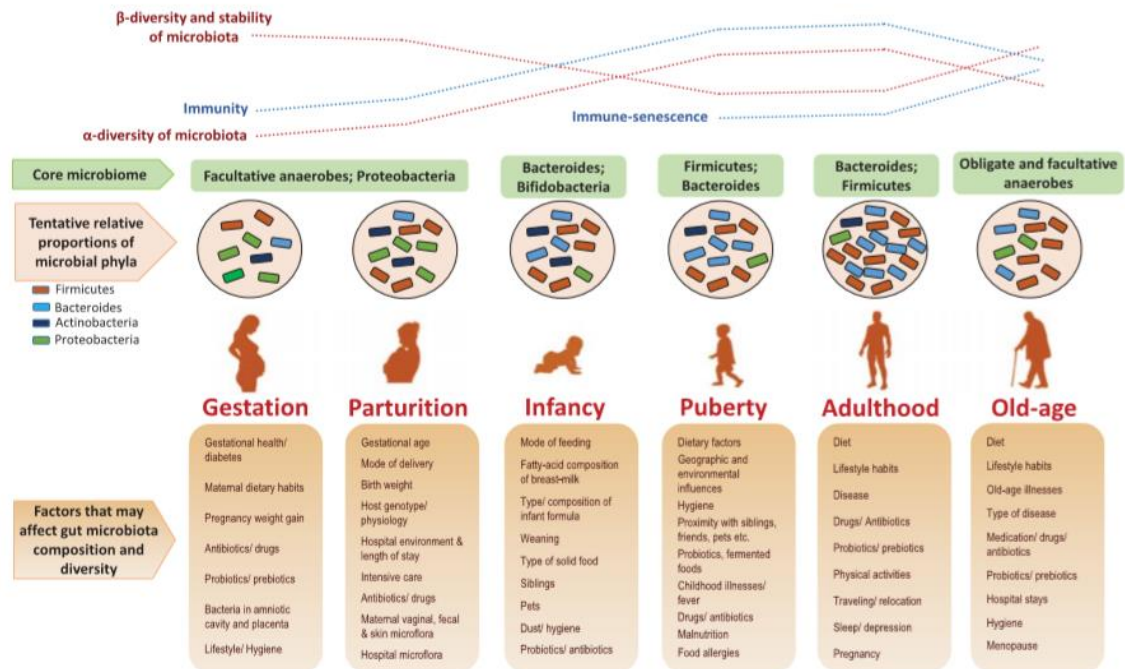


Figura 1. La microbiota humana y su diversidad con respecto a la edad humana (Nagpal y col., 2018)

A la microbiota humana se le han relacionado diferentes funciones importantes entre las cuales se encuentran: el metabolismo de nutrientes para facilitar su absorción, promover la diferenciación de diferentes tejidos, reducir el riesgo de la colonización por parte de microorganismos patógenos, regular la producción de ciertas sustancias que regulan funciones fisiológicas en otros órganos, la

susceptibilidad a padecer enfermedades inflamatorias, autoinmunes o alérgicas, la estimulación y regulación de la respuesta inmunológica innata en los tractos epiteliales (Pabst, 2016). Estas funciones están relacionadas con la composición filogenética de la microbiota:

Recientemente se ha determinado la importancia de la viabilidad de las bacterias en modelo murino, presentes en las mucosas, para llevar a cabo su función de regulación y de estimulación de la respuesta inmunológica. Barbet G y col. 2018, demostraron que a través del reconocimiento de los transcritos de ácido ribonucleico (ARN) bacteriano, las células CXC3R1+ presentes en el intestino producen IL-1 β , que promueve la diferenciación de los linfocitos T CD4+ a linfocitos cooperadores de folículo (Tfh, por su abreviatura en inglés). Esto permite una mayor diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de la inmunoglobulina G.

Diferentes estudios han demostrado que la microbiota también tiene un papel activo en la regulación fisiológica a nivel sistémico, como la regulación del apetito, desarrollo de las enfermedades crónico-degenerativas, la capacidad de absorción de lípidos y grasas en el intestino (Tropini y col., 2017) y del estado de ánimo. Estudios recientes han demostrado que la microbiota participa de forma activa en la producción directa de neurotransmisores o, de forma indirecta, a través de la estimulación de las células enterocromafines del intestino (Sterlin y col., 2020).

1.3 Calostro y lactancia materna

Hasta hace algunos años, se consideraba que el sistema inmunológico del recién nacido se encontraba en un estado de inmadurez inmunológica propia de la edad. Hoy en día, sabemos que su sistema inmunológico se encuentra en un proceso de adaptación a las nuevas condiciones del medio ambiente (Demirjian & Levy, 2009); generando una ventana de susceptibilidad a los patógenos.

Durante esta etapa de la vida, la interacción del recién nacido con el mundo exterior se limita al nicho materno. La madre resulta ser el origen principal de la carga antigénica para el neonato. Por esta razón, el bebé requiere una fuente de

factores que le brinden protección y regulen el desarrollo de su sistema inmunológico y hacer frente a estos retos antigénicos. Esto se logra a través de la transferencia materna durante la lactancia (Brandtzaeg P, 2010). La glándula mamaria es el órgano especializado encargado de la producción de la leche materna.

El desarrollo funcional de la glándula mamaria inicia durante la pubertad se desarrollan los ductos galactóforos constituidos por las células basales y las células lumbinales galactogénicas, a través de los estímulos hormonales de los estrógenos y la progesterona. Los estrógenos regulan el crecimiento de los ductos, mientras que la progesterona regula la ramificación de estos ductos a partir de la formación de los brotes terminales. Durante el embarazo, el estímulo constante de la progesterona promueve tanto la ramificación como la maduración de los ductos galactóforos.

En el último periodo del embarazo y durante toda la lactancia, la prolactina es la principal hormona reguladora de la maduración de la glándula mamaria. La glándula mamaria madura es una glándula túbulo alveolar compuesta, constituida por entre quince a veinte lóbulos mamarios, distribuidos en forma radial y separados por el tejido adiposo (Kingle. 2001).

La cantidad de los ductos desarrollados en el estroma mamario abarca más del 80 % del volumen total de la glándula mamaria. La unidad fundamental de la glándula mamaria lactogénica es el acino mamario. Durante la lactancia, cada glándula está formada por unos cien acinos que se conectan, a través de los conductillos, a un conducto galactóforo común que converge en el pezón (Brisken & O'Malley, 2010).

El acino mamario presenta dos tipos de tejido principales: el tejido epitelial, compuesto por las células alveolares maduras, encargadas de la producción de leche, y las células mioepiteliales, encargadas de la contracción muscular para la eyección de leche; y el tejido estromal, conformado por los fibroblastos, el tejido adiposo, las células neuronales, las células troncales y las células del sistema inmunológico como los linfocitos T citotóxicos CD8+, los linfocitos T CD4+, los linfocitos $\gamma\delta$, los neutrófilos, los macrófagos, las células Natural Killer

(NK), las células dendríticas, los linfocitos B y las células plasmáticas productoras de IgA (Brandtzaeg, 2013).

Durante los primeros tres días de la lactancia, se produce una sustancia de secreción conocida como el calostro. Su producción aumenta en forma progresiva desde los 50 hasta 100 mL diarios, dependiendo de la intensidad y la frecuencia del estímulo de succión. El calostro presenta un color amarillento característico, por la presencia de β -carotenos, contiene 87% de agua, una concentración de sodio de 0.48 mg/mL y un pH de 7.45, que favorece el vaciamiento gástrico.

El calostro se considera una fuente importante de factores de protección, estímulo y desarrollo para el recién nacido. Entre estos factores se encuentran la lactoferrina, la carboxipeptidasa B2, la quimiocina epitelial asociada a mucosa (CCL28), la defensina 1, la proteína amiloide sérica A, la hormona del crecimiento que acelera la regeneración ósea, el factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF α y TGF β , por sus siglas en inglés) que regulan la migración y la proliferación celular y el factor de crecimiento fibroblástico que es un potente estimulador de la angiogénesis y el factor de crecimiento epidérmico, que tiene una función importante en la inducción de tolerancia a los microorganismos de la microbiota en el intestino del neonato, a través de la inhibición de la actividad de las células caliciformes asociadas a la respuesta contra los patógenos intestinales (Knoop y col., 2017).

La mayor proporción del contenido proteínico en el calostro comprende a las inmunoglobulinas (Niewiesk, 2014). Antes se consideraba que la única función de los anticuerpos derivados de la lactancia materna era la de proteger a las mucosas del recién nacido contra los microorganismos del medio exterior. Ahora se sabe que las inmunoglobulinas tienen una función más activa en la regulación de la respuesta inmunológica a través de la inducción de tolerancia a potenciales microorganismos comensales que están arribando a la mucosa intestinal del bebé (Nabhani y col., 2019).

De los isotipos de inmunoglobulina, el calostro es la fuente más importante de IgA para el recién nacido. La IgA tiene una concentración de aproximadamente 25 mg/mL en el calostro (Brandtzaeg, 2013; Sánchez-Salguero y col., 2018).

1.4 Subtipos de IgA en el calostro

La IgA es una glicoproteína que pertenece a uno de los cinco isotipos de inmunoglobulina. La IgA es la glicoproteína más abundante en el cuerpo ya que su producción es de unos 3 gramos diarios para un adulto promedio. La IgA tiene una concentración en suero de 3,5 mg/mL, de la cual, 97 % se encuentra como monómero (IgAm). La IgAm pesa aproximadamente 160 Kilodaltons (KDa) y está constituida por dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 55 KDa con 4 dominios de inmunoglobulina (VH, C α 1, C α 2 y C α 3) y dos cadenas ligeras (L) de 25 KDa con 2 dominios de inmunoglobulina (VL y CL) (Strugnell & Wijburg, 2010; Woof & Russell, 2011).

Las cadenas H y L son idénticas entre sí en una misma molécula de anticuerpo, confiriendo dos sitios idénticos de unión al antígeno. Al conjunto de los dominios VL, CL, CH y C α 1 se le conoce como la región de unión al antígeno (Fab). A la región compuesta por los dos dominios C α 2 y los dos C α 3 de ambas cadenas pesadas se le conoce como fracción cristalizante (Fc) (Woof & Russell, 2011).

En el humano existen dos genes de α 1 y α 2 localizados en el cromosoma 14, que codifican para las dos subclases de IgA: la inmunoglobulina A subtipo 1 (IgA1) y la inmunoglobulina A subtipo 2 (IgA2) con tres alotipos IgA2m(1), IgA2m(2) e IgA2m(n) (Brandtzaeg, 2013).

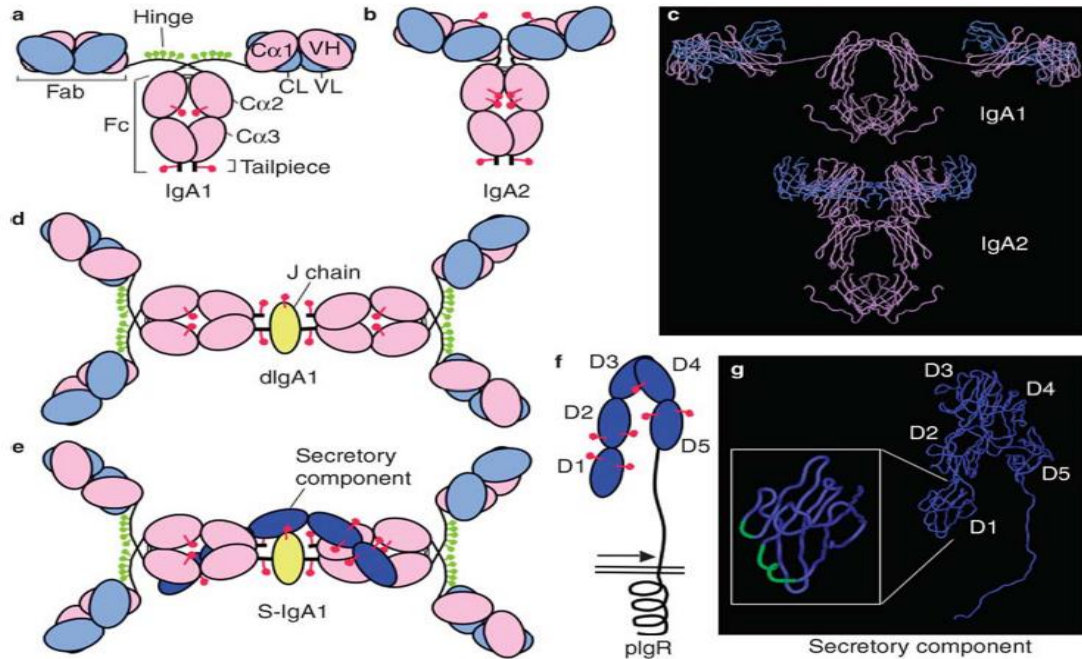


Figura 2. Subclases de IgA en el ser humano (Woof & Russell, 2011)

El origen de la IgA de calostro inicia con los linfocitos B maduros inexpertos que acaban de salir de médula ósea e ingresan a las estructuras del tejido linfoide de las mucosas, por las vénulas de endotelio alto y arriban a los sitios inductores para la interacción con su antígeno (Hoffman y col., 2016).

La distribución de las células productoras de los subtipos de la IgA en los diferentes compartimentos anatómicos, depende de la expresión de integrinas y sus ligandos como la integrina $\alpha 4\beta 1$ y su ligando, la proteína de adhesión vascular 1 (VCAM-1); y de las quimiocinas y sus receptores, CCR10/CCL28, para las células productoras de IgA1 (Low y col., 2010); y de la integrina $\alpha 4\beta 7+$ y su ligando la molécula de adhesión celular asociada a mucosas-1 (MadCAM-1); y de las quimiocinas y sus ligandos CCR10/CCL28 y CCR4/CCL9 para las células productoras de IgA2 (Bourges y col., 2008). La IgA1 se encuentra presente en el tracto respiratorio superior, en el suero y en las secreciones como la saliva y las lágrimas. Mientras que la IgA2, está más asociada al tracto gastrointestinal, específicamente el intestino grueso.

Durante el embarazo, las células endoteliales de la glándula mamaria expresan MadCAM-1, VCAM-1, CCL28 y CCL9, bajo la regulación hormonal de estrógenos

y progesterona (Briskin & O'Malley, 2010). Esto permite una migración selectiva de las células productoras de los subtipos de IgA. Estas células pueden mantenerse durante los últimos meses del embarazo y en la lactancia para llevar a cabo la producción local de la IgA (Pakkanen y col., 2010).

La IgA asociada al receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR) es endocitada y transportada por un proceso conocido como transcitosis a la cara apical. El transporte vesicular puede darse en ambas direcciones y está mediado por la actividad de las clatrininas. El tránsito de los endosomas tempranos a los endosomas de reciclaje apicales depende de la participación de los microtúbulos de la célula endotelial. Los endosomas de reciclaje arriban a la superficie celular, donde se lleva a cabo la escisión del pIgR para la formación del componente secretor (SC, por sus siglas en inglés), que se libera en el medio apical, por la acción de enzimas serinproteasas, expresadas cerca de la cara apical del epitelio. Al complejo molecular de la IgA asociada con el SC se le conoce como la IgA secretora (IgAS). La IgAS, una vez liberada a la luz del acino mamario, es transportada por efecto de succión y contracción muscular con el calostro hasta el pezón, para su salida al exterior (Brandtzaeg, 2013).

1.5 Microbiota en el calostro humano

Hasta hace algunos años, se consideraba que el calostro era una secreción estéril. Hoy se sabe que el calostro contiene una importante cantidad de microorganismos y es una fuente importante de oligosacáridos de leche humana, los cuales son una fuente de alimento para la propia microbiota (Moossavi y col., 2019).

La composición microbiana de la glándula mamaria de una mujer lactante es diferente a la de una mujer no lactante, principalmente a lo largo del ducto mamario (Demmelmair y col., 2020). Esto depende del tipo de alimentación durante el embarazo, la lactancia, el tipo de parto y el momento de la lactación. Esta composición y variabilidad microbiana es alta cerca del pezón y disminuye a lo largo de los ductos ramificados y en los acinos.

La composición de la microbiota de calostro puede mantenerse estable en complejidad y diversidad durante prácticamente los tres primeros días de producción del calostro (Knoop y col., 2017). Algunos de los géneros bacterianos, desde el punto de vista epidemiológico, poseen propiedades potencialmente patógenas. La microbiota presente en el calostro también se considera que es un estímulo y señal para el desarrollo y maduración de las mucosas del recién nacido (Korpela & Vos, 2018). Recientemente, se demostró que una fracción de estas bacterias presentes en el calostro, se encuentran asociadas a anticuerpos, principalmente, IgA en incidencia media y media baja (Bunker & Bendelac, 2018). Sin embargo, lo que sabemos del efecto biológico de la asociación de la microbiota con la IgA se han limitado, en su mayoría, al tracto gastrointestinal: Donaldson y col. 2018, demostraron que la asociación de las bacterias con la IgA tiene un papel de regulación en la composición filogenética de la microbiota intestinal (Fadlallah y col., 2018). Esta asociación también puede ser inducida por las propias bacterias: *B. fragilis* es capaz de modificar las moléculas que expresa en su superficie para poder asociarse con una mayor avidéz a la IgA intestinal. Esto permite que la bacteria pueda colonizar el intestino de forma más eficiente. La IgA parece tener una función reguladora contra géneros bacterianos que estimulan la respuesta inmunológica en condiciones inflamatorias (Pabst y col., 2016). Palm N y col., demostraron que las bacterias colitogénicas, decoradas con una mayor cantidad de IgA, en pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino empeoraban el cuadro inflamatorio local, en comparación con aquellas bacterias relacionadas con la regulación de la homeostasis intestinal (Palm N y col., 2014).

Bunker y col., determinaron que la IgA en el ratón se asocia a especies específicas de la microbiota local o a patógenos potenciales dependiendo de si su origen fue por una respuesta T dependiente o T independiente (Bunker y col. 2015; Pabst & Slack, 2020). En un estudio reciente, Sterlin y colaboradores, describieron que la mayoría de la microbiota comensal IgA+ en muestras fecales de adultos, está unida a la IgA2. Estos datos sugirieron que esta subclase tendría

un papel más relacionado con la regulación de las bacterias comensales en condiciones homeostáticas en el tracto intestinal (Sterlin y col., 2020).

Ladjeva y col., describieron una gran variabilidad individual en la distribución de los subtipos IgA1 e IgA2 de calostro, con respecto a su especificidad hacia los antígenos microbianos y hacia ciertos alimentos. Algunos antígenos parecen inducir una respuesta inmunológica más pronunciada hacia uno de los subtipos de IgA presentes en el calostro: los anticuerpos contra los antígenos proteicos, como la gamma globulina bovina, lactoglobulina, el toxoide tetánico, los antígenos I y II de *Streptococcus mutans* y la vacuna de virus de influenza, se asociaron con mayor frecuencia con la subclase IgA1; mientras que los anticuerpos contra el LPS de *E. coli*, el polisacárido de *S. pneumoniae*, la hemaglutinina de *H. influenzae* tipo b, se asociaron con mayor frecuencia a la subclase IgA2 (Ladjeva y col. 1989).

Por estudios epidemiológicos se sabe que, a través de la inmunización materna durante el embarazo, se puede inducir la producción de anticuerpos a nivel sistémico y en el calostro. Estos anticuerpos de calostro parecen tener un papel muy importante en la protección que la madre provee al recién nacido durante la lactancia. Recientemente, nuestro grupo de investigación describió que la interacción antigénica durante el embarazo incrementaba los niveles de las subclases de IgA en el calostro dependiendo de la composición química del antígeno. Los niveles de IgA1 específica de antígeno incremento en mujeres con previa vacunación con toxoide tetánico (antígeno proteico), mientras que la IgA2 específica de antígeno incrementó en madres con refuerzo de polisacárido de neumococo (Sánchez-Salguero y col., 2020).

El interés en el estudio de la microbiota del calostro humano se ha incrementado en los últimos años porque los estudios han sugerido que la microbiota del calostro participa activamente en modelar la composición bacteriana en el intestino del recién nacido. El calostro ahora se considera una fuente importante de géneros bacterianos asociados con la estimulación del sistema inmunológico y con el mantenimiento de la homeostasis en las mucosas del neonato (Korpela y col., 2018). La IgA tiene como función no solo neutralizar microorganismos

patógenos, sino que directamente regula la composición de la microbiota. Diversos estudios han demostrado que una posible explicación de esta función aparentemente dual de la IgA se debe al origen de esta: la IgA de respuesta T dependiente describe mayor reconocimiento de bacterias patógenas, mientras que la IgA de respuesta T independiente está asociada con bacterias comensales (Bunker & Bendelac, 2018).

La distribución de la microbiota con los subtipos de IgA en el calostro y el posible papel de esta asociación en la transferencia materna de la microbiota para el recién nacido, no se ha descrito. Un posible abordaje experimental sería utilizar muestras de calostro y heces de los neonatos (antes y después de los primeros días de alimentación con leche materna exclusiva), ya que estas son un indicador indirecto de la composición de la microbiota intestinal. Esta distribución de bacterias asociadas a IgA1 e IgA2 en calostro, podría tener un efecto importante en las mucosas del recién nacido durante la transferencia materna.

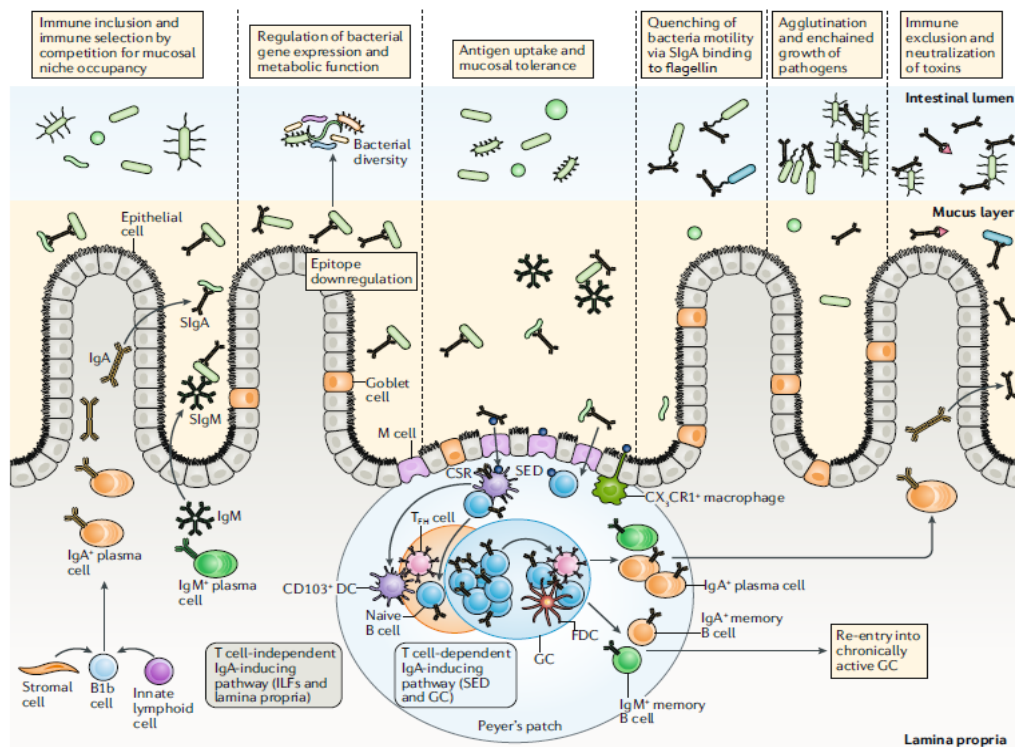


Figura 3. Relación de la IgA con la microbiota en el recién nacido (Chen y col., 2020)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La transferencia pasiva de anticuerpos y activa de bacterias al recién nacido por medio de la lactancia materna son procesos muy importantes durante los primeros momentos de la vida. El calostro es la principal fuente de las subclases de IgA, solubles y asociadas a una fracción de la microbiota presente en esta secreción. Una vez transferidas al recién nacido, la IgA juega un papel clave en la protección del tracto gastrointestinal a través de la exclusión inmune (Brandtzaeg P, 2013).

Estudios realizados en humanos han demostrado que la ausencia de IgA en el intestino modifica de forma importante la composición de la microbiota e incrementa la susceptibilidad para padecer enfermedades inflamatorias y cuadros alérgicos en la vida adulta (Fadlallah y col., 2018).

Sin embargo, no es clara la aparente función contradictoria que la IgA tiene durante la lactancia en el establecimiento de la microbiota en el recién nacido. Diferentes trabajos han demostrado que las subclases de IgA reconocen diferentes tipos de antígenos dependiendo de su naturaleza química (Ladjeva y col., 1989; Sánchez-Salguero y col., 2020). Recientemente, Sterlin y col. (Sterlin y col., 2020) demostraron que la microbiota en el intestino de infantes, de 30 días de vida, esta mayormente asociada a la IgA2, sugiriendo una participación mucho más activa en la regulación del establecimiento de la microbiota que el subtipo IgA1.

Por lo cual, es importante determinar cuál es la microbiota que se encuentra asociada a las subclases de IgA en el calostro y su papel en el proceso de colonización de las bacterias en el intestino del recién nacido.

3. HIPÓTESIS

Las fracciones de bacterias (IgA1+ e IgA2+) transferidas durante la lactancia, tendrán una composición similar con la microbiota fecal del recién nacido.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar y comparar la composición, abundancia y diversidad de bacterias recubiertas con IgA1 e IgA2 en el calostro y en las muestras fecales del recién nacido.

4.2 Objetivos particulares

4.2.1.- Determinar la asociación de bacterias con subclases de IgA presentes en el calostro humano.

4.2.2.- Caracterizar la diversidad bacteriana asociada a las subclases de IgA del calostro humano.

Analizar la composición, abundancia y diversidad de bacterias asociadas con subclases de IgA en calostro y heces.

4.2.3.- Determinar la asociación de bacterias con subclases de IgA en meconio y heces del recién nacido a los tres días de vida.

4.2.4.- Caracterizar la diversidad bacteriana asociada a las subclases de IgA en meconio y heces del recién nacido a los tres días de vida.

Analizar la composición, abundancia y diversidad de bacterias asociadas con subclases de IgA en calostro y heces del recién nacido a los tres días de vida.

4.2.5.- Analizar antígenos reconocidos por los anticuerpos IgA2 presentes en las fracciones de bacterias IgA2+ en las heces del neonato a los tres días de vida.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño y tipo de estudio

El presente fue un estudio descriptivo observacional de tipo transversal. La selección de la población se llevó a cabo a través de un proceso aleatorio simple: Se reclutaron mujeres clínicamente sanas que acudieron a la atención de su parto en el Hospital Regional 1º de octubre (HR 1º de octubre) del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE). Todas las actividades detalladas en este protocolo tienen aprobación del Comité de Investigación y Bioética de: Hospital Regional Primero de Octubre (090201/14.1/086/2017),

Se registraron los datos sociodemográficos, antropométricos y clínicos (escolaridad, ocupación, edad materna y gestacional, paridad, tipo de parto, sexo y peso al nacer). De cada binomio donante se colectaron entre 2-3 mL de calostro y muestra fecal del recién nacido a los tres días de vida (500 a 2000 mg).

El tamaño de muestra se determinó mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia, tomando en cuenta a las pacientes recién paridas que fueron reclutadas en el periodo de noviembre de 2017 a julio de 2019.

5.2 Criterios de inclusión

Se consideraron mujeres de entre 25 a 30 años, con un embarazo a término (38-42 semanas de gestación), por parto fisiológico (F), que hayan acudido con regularidad a su atención médica para el seguimiento de su embarazo, con parto de producto único, que aceptaron participar en el proyecto y firmaran la carta de consentimiento informado.

5.3 Criterios de exclusión

No se incluyeron mujeres que, por algún motivo, se encontraran imposibilitadas para la lactancia materna, que refirieran enfermedad crónico-degenerativa, que

se encontraran en tratamiento farmacológico, hormonal o con antibióticos; que reportaran consumo de alcohol y/o tabaco durante el embarazo, y que por alguna razón no decidieran seguir en el estudio o que refirieran alguna enfermedad aguda en las últimas 3 semanas previas al parto.

5.4 Muestreo

Previo a su parto, a las pacientes que aceptaron participar en el estudio, se les entregó un consentimiento informado, el cual leyeron y firmaron de acuerdo con el tratado de Helsinki, la ley general de salud vigente (LGS) y el comité de ética del Hospital.

Se les entregó un cuestionario, el cual llenaron con sus datos generales e información clínica. Los datos reportados por las pacientes fueron corroborados con la historia clínica facilitada por el médico de cabecera.

Las tomas de muestra se realizaron, bajo condiciones asépticas, con el uso de material estéril y por el personal médico calificado:

El meconio se obtuvo durante el trabajo de parto y/o con la primera evacuación del neonato. El muestreo del calostro se llevó a cabo, según lo descrito en la técnica de extracción de leche en las clínicas de lactancia en Hospitales Infantiles y Generales (SinDis), dentro de las primeras horas posparto; previa limpieza del área del pezón y areola con solución salina fisiológica y gasas estériles. Se cuidó que, durante su permanencia en el hospital, los neonatos fueran alimentados con leche materna exclusiva. Al momento del alta del binomio, se solicitó una muestra de heces del neonato a los 3 días posparto.

Como control de la transferencia materna, se utilizaron muestras de leche pasteurizada obtenidas del Banco de Leche del hospital, estas muestras consistieron en leche preparada de madres donantes con menos de siete días de parto, pasteurizada a 63 °C por 30 min y se administran a los neonatos como una opción de alimentación recomendada cuando la alimentación con la propia leche materna no es viable. Posterior al tratamiento se tomó una muestra de 2 mL. Finalmente, se incluyó el muestreo (meconio y heces) de un grupo de

neonatos (n= 6) que, por indicaciones del pediatra, fueron alimentados con fórmula láctea.

Las muestras se mantuvieron a 4 °C para su traslado al laboratorio, para ser procesadas dentro de los primeros 20 minutos después de la toma de muestra.

5.5 Separación de las fases

Para las muestras de meconio y heces, se tomaron 500 mg y se re suspendieron en 2 mL de amortiguador de fosfatos salino (PBS) estéril a pH 7,4. Todas las muestras se trataron con una mezcla de inhibidores de proteasas PMSF, TPCK y TLCK (con 0.01 % de azida de sodio en PBS) a pH 7,4.

Las muestras se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos a 4°C. Se obtuvieron 3 fases: a) una fase lipídica, en parte superior; b) una fase acuosa en la parte media y c) componentes celulares en la parte inferior. La fase acuosa se separó de los componentes celulares por pipeteo y la pastilla fue desechada.

Para asegurar una mejor separación, la fase acuosa obtenida se llevó a una segunda centrifugación a 8 000 g durante 30 minutos a 4°C ambos ciclos en una centrífuga *Allegra X-22 Series Beckman Coulter® USA*. Se obtuvieron dos fases: el sobrenadante y la pastilla. El sobrenadante se almacenó en alícuotas a -70°C para la determinación de inmunoglobulinas libres por ELISA y la pastilla se procesó para separar fracciones de bacterias asociadas a las subclases de IgA (IgA1+ e IgA2+) o fracción libre (IgA-).

5.7 Cuantificación de inmunoglobulinas

La cuantificación de inmunoglobulinas en las muestras se realizó como lo descrito en Sánchez-Salguero y col., 2019:

Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano *Thermo scientific® MaxiSorp USA Lote 1132249* con 100 µL de anticuerpo monoclonal de ratón [7A09] anti-cadena ligera humana ($\kappa+\lambda$) abcam 1942 (*Anti-human Ig light chain antibody [7A09] ab1942 Cambridge UK*), a una concentración de 1µg/mL en PBS, durante un tiempo de incubación de 12 horas a 4°C. El bloqueo se llevó

a cabo con 200 μ L por pozo de PBS-Tween 20 0,05 %, durante 90 min a 25 °C. Para el desarrollo de la curva estándar, se adicionaron 100 μ L por pozo de las soluciones estándar preparadas a partir de reactivos comerciales de inmunoglobulinas humanas purificadas: IgA1 (*Natural human protein IgA1 ab91020*) e IgA2 (*Natural human protein IgA2 ab91021 Cambridge UK*) en PBS; durante un tiempo de incubación de 2 horas a 37°C.

Para la detección de IgA1 en calostro, se adicionó un anticuerpo monoclonal de ratón acoplado a biotina en su región Fc anti IgA1 humana (*Mouse monoclonal B3506B4 Cambridge UK Anti-human IgA1 Fc (Biotin) ab99796*) en una dilución de 1:2000. Para la detección de IgA2 en calostro, se adicionó un anticuerpo monoclonal de ratón acoplado a biotina en su región Fc anti IgA2 humana (*Anti-IgA2 antibody [A9604D2] Cambridge UK (Biotin) ab128731*) en una dilución de 1:1000. Finalmente se adicionaron 100 μ L por pozo de una dilución 1:5000 de complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) (*Streptavidin HRP ab7403*), y se dejó incubando durante 1 hora a 37°C. Para el revelado se utilizaron 100 μ L por pozo de 3'3"-5-5-tetrametil bencidina (TMB) con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (*TMB ELISA substrate high sensitivity abcam 171523 Cambridge UK*) se incubó en un intervalo de entre 5 a 10 min. La reacción se detuvo con la adición de 100 μ L de H₂SO₄ 0,2 M, las placas se leyeron en el espectrofotómetro (*Sunrise absorbance reader, Tecan's Magellan® universal reader*) a 450 nm.

En todos los casos se hizo uso del programa *GraphPad Prism® versión 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com*.

5.8 Separación de bacterias en fracciones IgA1+ e IgA2+

Las pastillas fueron procesadas para la separación de las fracciones de bacterias presentes con respecto a su asociación con los subtipos de IgA, de acuerdo con la metodología previamente descrita por Bunker y col., 2015:

Se llevó a cabo el bloqueo con 0.25 % de BSA, 5 % de SFB y 2 mM de EDTA en PBS durante quince minutos, posteriormente se lavaron con PBS por cinco ocasiones y se re suspendieron en un volumen final de 1 mL. El volumen total de la muestra se separó en cuatro tubos estériles: a) bacterias totales, b) bacterias libres (IgA -), c) bacterias asociadas a IgA1 (IgA1+) y d) bacterias asociadas a IgA2 (IgA2+). La separación de las fracciones de bacterias, dependiendo de su asociación a IgA, se realizó con el uso de anticuerpos monoclonales en ratón, contra subtipos de IgA humanos, descritos en la sección **Cuantificación de inmunoglobulinas**. Posteriormente, se adicionó complejo estreptavidina asociada con APCy7, para la detección de bacterias IgA2+; o con FITC, para la detección de bacterias IgA1+. Finalmente se adicionaron micro perlas decoradas con anticuerpos monoclonales de ratón anti APCy7 o FITC, según el caso. Con el uso de un magneto para la separación celular, se llevó a cabo la selección positiva de las bacterias decoradas con los subtipos de IgA. La pureza de las fracciones de bacterias IgA1+, IgA2+ e IgA- se verificó por citometría de flujo.

5.9 Extracción y purificación de ADN genómico

A partir de las fracciones se obtuvo el DNA presente con el kit de extracción *FavorPred Milk Bacterial DNA Extraction Kit* (Favorgen), y *mini kit QIAmp DNA Stool* (Qiagen, Reino Unido). La concentración de ADN total purificado se determinó mediante el cociente de absorbancia 260/280 utilizando el equipo *NanoDrop Lite Spectrophotometer* (Thermo Scientific) y su calidad se visualizó por fraccionamiento electroforético en gel de agarosa al 0.5%, teñido con 0.80 µL de colorante *Midori Green advanced* (1:15), utilizando regulador de corrida TBE 0.5X (Tris-Borato-EDTA), mezclando 1 µL de regulador de carga (azul de bromofenol, glicerol 2X), con 5 µL de DNA, aplicando 90 Volts durante 50 min. La visualización de las bandas de interés se realizó con el sistema de documentación "*Molecular Imager® Gel Doc™ XR de BioRad*".

5.10 Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S rRNA

De cada muestra de ADN, se amplificó un fragmento de 281 pdb correspondiente a la región hipervariable V3 del DNA ribosomal 16S bacteriano. Se utilizaron los cebadores universales que están dirigidos para la amplificación de la región polimórfica V3 del gen de rDNA, V3-341F y V3-518R, conteniendo el adaptador para la secuenciación masiva (García-Mena y col., 2016). La amplificación se realizó mediante PCR punto final utilizando los cebadores y condiciones descritas en las tablas 1 y 2, trabajando con un volumen final de 50 µL por reacción. La visualización de las bandas de interés se realizó con el sistema de documentación “*Molecular Imager® Gel Doc™ XR de BioRad*”, esperando un tamaño de fragmento de 281 pdb. Las genotecas se secuenciaron en la plataforma *Ion Torrent PGM (Life Technologies)* utilizando el Chip 318, según el protocolo recomendado (Murugesan y col., 2015).

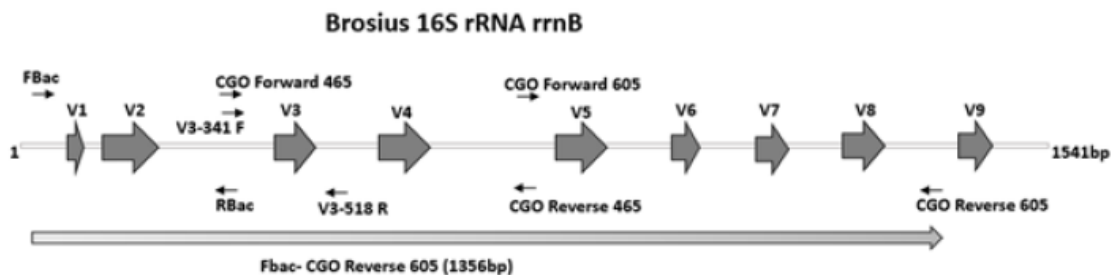


Figura 4. Regiones del 16s rDNA (García-Mena y col., 2016)

Tabla 1. Cebadores y mezcla de reacción para la amplificación de la región V3.

Cebadores:

V3 341F: 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG -3' (Secuencias asignadas BARCODE)

V3 518R: 5'- ATTACCGCGGCTGCTGG- 3

Tamaño del producto: **281 pdb**

DNA por Reacción: **50 ng**

Volumen por reacción: **50 µL**

Reactivo	[Stock]	Concentración final	Volumen / muestra
Amortiguador	10x	1x	5 µL
MgCl ₂	25 mM	2 mM	4 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1 µL
V3 341F	10 µM	0.2 mM	1 µL
V3 518R	10 µM	0.2 mM	1 µL
Taq pol	5 U/µL	0.025 U/µL	0.25 µL

Tabla 2. Condiciones de la PCR para la amplificación de la región V3 16s rDNA

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	10 min	1 ciclo
Desnaturalización	95 °C	15 s	25 ciclos
Alineamiento	62 °C	15 s	
Extensión	72 °C	15 s	
Extensión final	72 °C	10	1 ciclo
	10 °C	10	

5.11 Secuenciación masiva semiconductor de iones por Ion Torrent

Después de preparar la genoteca de amplicones para las muestras de leche materna y de copro, se llevó a cabo el análisis de calidad, así como el acondicionamiento de las genotecas de las muestras para su secuenciación en el equipo Ion Torrent de acuerdo con la siguiente descripción:

Preparación de genotecas: Las muestras se mezclaron con etiquetas (*barcodes*), se purificaron y se obtuvo la concentración final de DNA en la genoteca

Análisis de calidad del DNA se verificó el tamaño de los amplicones de la genoteca utilizando el equipo *Bioanalyzer 2100*

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

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

Análisis de datos: Las señales se convirtieron en lectura de bases, se analizó la calidad del proceso, las lecturas obtenidas y la generación de archivos de cada muestra de acuerdo con la lista de *barcodes* empleados, se obtuvieron los archivos en formato FASTQ para su posterior análisis. Las secuencias y los archivos de mapeo correspondientes para todas las muestras utilizadas en este estudio se depositaron en el repositorio de NCBI BioSample PRJNA707069 ID 707069 - BioProject - NCBI ([ID 707069 - BioProject - NCBI \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/707069)).

5.12 Análisis de los datos de secuenciación y métodos estadísticos

Las lecturas obtenidas por el equipo se procesaron utilizando el “*software Torrent Suite v4.4.3*” el cual filtró las lecturas para excluir secuencias policlonales y de baja calidad. Se asignaron las lecturas a la muestra de origen por medio de los cebadores de DNA (Anexos Tabla 3). El control de calidad de las secuencias se realizó con *FastQC* y todas las lecturas se recortaron a 200 nt de longitud con *Trimmomatic v0.36*.

Las lecturas que pasaron las pruebas de calidad fueron exportadas como archivos *FASTQ* que posteriormente fueron transformados a archivos *FASTA*, y fueron analizados con el *software QIIME pipeline* versión 1.9.1. (<http://qiime.org/>).

Las secuencias se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) la asignación taxonómica se llevó a cabo por el alineamiento de las secuencias contra la base de datos 16S rRNA Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/>).

5.13 Análisis estadístico de la microbiota

La diversidad microbiana se calculó usando diversidad alfa (dentro muestras) y diversidad beta (entre muestras). La diversidad alfa se estimó usando las especies observadas y los diferentes índices: Chao (riqueza), de diversidad de Shannon y Simpson (dominancia). Estos índices se determinaron usando paquetes *phyloseq* y *ggplot2* en el entorno R (v3.4.4) (<https://r-project.org/>).

Para la diversidad beta, la disimilitud se estimó utilizando análisis UniFrac (weighted y unweighted). Se generó un diagrama de dispersión bidimensional utilizando el análisis de coordenadas principales (PCoA). Se aplicaron las pruebas estadísticas de ANOSIM y Adonis.

La abundancia relativa de los grupos bacterianos identificados en las muestras se comparó por la prueba de rangos de Wilcoxon mediante el software el programa SPSS (versión 14.0)

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

El algoritmo LDA Side Effect (LEfSe v1.0) fue usado para identificar taxones estadísticamente significativos in los diferentes grupos de muestras (Segata y col., 2011). Utilizamos el LDA (análisis discriminante lineal) para estimar el tamaño del efecto de cada taxón entre grupos con LDA – score ≥ 2.5

Se usó PICRUST v1.1.1 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States), para predecir metagenomas funcionales basados en datos del gen rRNA 16S con la base de datos de clasificación de ortólogos de Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) en el nivel de jerarquía 3 caminos El análisis estadístico del *software Taxonomic and Function* (STAMP v2.1.3) se utilizó para determinar diferencias significativas en la abundancia de OTU y vías metabólicas.

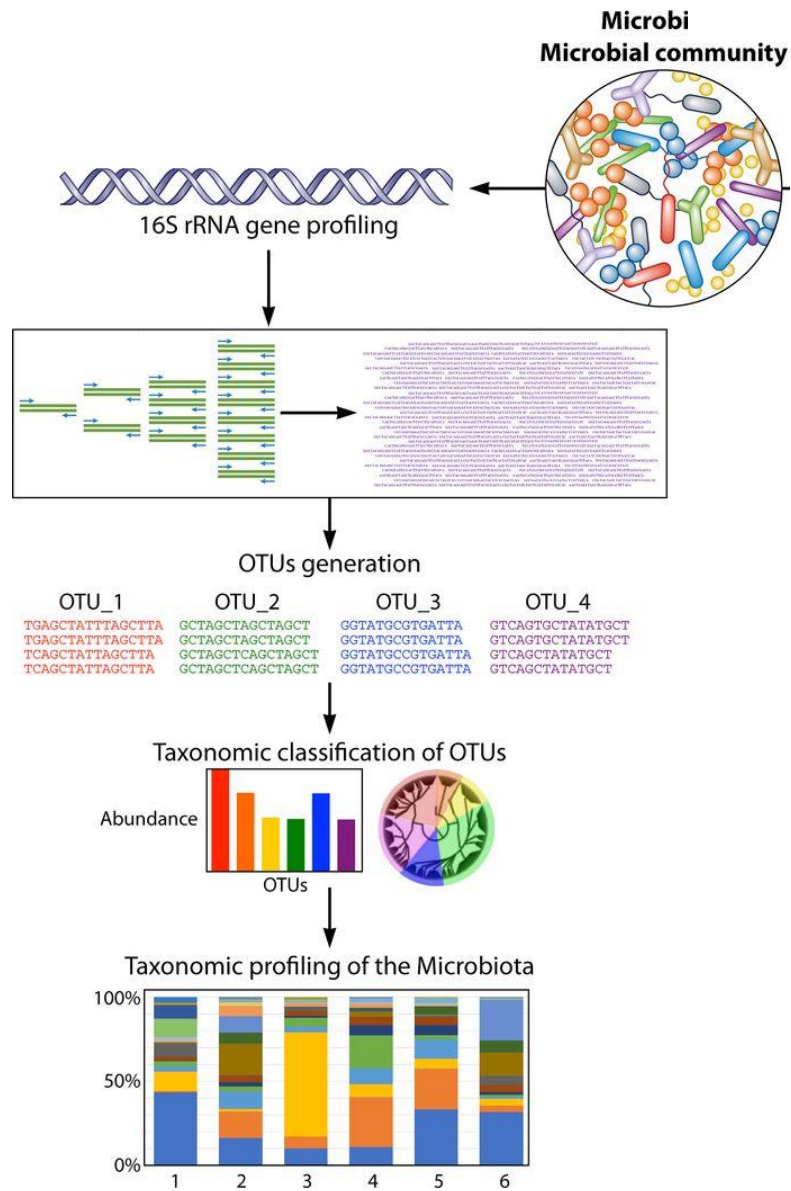


Figura 5. Descripción general de análisis bioinformático (<http://greengenes.html>)

5.14 Ensayo de degradación de la IgA1

Para determinar si la pérdida de señal de IgA1 se debió a la actividad de degradación enzimática bacteriana, se utilizó IgA1 humano (Cat # ab91020, Abcam®), a 10 mg / mL o IgA2 humano (Cat # ab91021, Abcam®), a 12 mg / mL diluido en PBS. Estas proteínas fueron incubadas con la fracción de 100.000 bacterias De IgA1+ o la fracción de 200.000 bacterias de IgA2+ aislada del calostro humano; a 4 °C (como control de temperatura) o 37 °C. Independientemente, incluimos las mismas fracciones con un cóctel inhibidor de

proteasa (Cat #P8465, Sigma-Aldrich®) (como control negativo). Todas las muestras se incubaron durante un período de hasta dos horas. En cada intervalo de 20 minutos, retiramos y congelamos una alícuota para cuantificar IgA1 o IgA2 por ELISA, como se describió anteriormente.

5.15 Western blot de Serin hidroximetil transferasa (SHMT)

Las suspensiones bacterianas IgA1+ e IgA2+ del calostro humano fueron tratadas como se mencionó anteriormente y mezcladas con el agente reductor de muestras NuPAGE 10x (Cat# NP0004 Life Technologies® Thermo Fisher Scientific®). Se añadieron tres carriles de control: control positivo, compuesto por SHMT bacteriano recombinante (#Cat LS-G78730-20 LS Bio®, Seattle WA, EE.UU.), control negativo, compuesto por gliceraldehído bacteriano purificado 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (#Cat NATE-1635 Creative Enzymes®, Shirley NY, EE.UU.), y bacterias de calostro no asociadas con subclases IgA (IgA-). Se cargaron doscientos microgramos de proteínas en cada carril, separados en geles de electroforesis de poliacrilamida al 10 % (Cat# 3450009 Bio-Rad®) a 80 V durante 90 minutos transferidos a membranas de nitrocelulosa (Cat# 1620115 Bio-Rad®) a 100 V durante 120 min. Las membranas se bloquearon en leche en polvo sin grasa al 5 % (Cat# 9999S Cell Signaling Technology® Danvers MA, USA) en TBST. Después de tres lavados con PBST, se añadieron 2 µg/mL de anticuerpo IgA monoclonal anti-SHMT ratón (clon W27) y se incubaron durante la noche a 4 °C, como se informó anteriormente [42]. Al día siguiente, la membrana fue lavada, y una mezcla de HRP-cabra anti-ratón IgA (Cat # 1040-05 Southern Biotech®) en 1: 8.000 dilución, y HRP-cabra antibacteriano GAPDH. (Cat# G8140-13H United States Biological®, Salem MA, USA) a la 1:10.000 se añadieron e incubaron dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se lavó y las señales se visualizaron utilizando el kit de sustrato Clarity™ Western ECL (Cat# 170-5061 BioRad®) y se detectaron en el software Chemidoc™ XRS+ System Molecular Imager Gel (BioRad®) e ImageJ®.

6. RESULTADOS

6.1 Controles para descartar contaminantes ambientales en muestras de baja biomasa

Dado que las muestras a utilizar pueden tener una biomasa microbiana baja, la contaminación con materiales y reactivos de laboratorio fue un riesgo constante; por lo cual, el proceso de muestreo fue realizado por personal médico calificado utilizando material estéril. Se corroboró que ni los materiales ni el procedimiento contaminaran las muestras al incluir varios controles. Los controles incluyeron: "Material de muestreo" (hisopos, tubos y depresores de lengua analizados en las mismas condiciones que las muestras de meconio). "Medio ambiente" (tubos abiertos en el entorno hospitalario durante el proceso de muestreo) y "Descontaminación de la mezcla maestra para la PCR" (como se describe más adelante) (Figura 6).

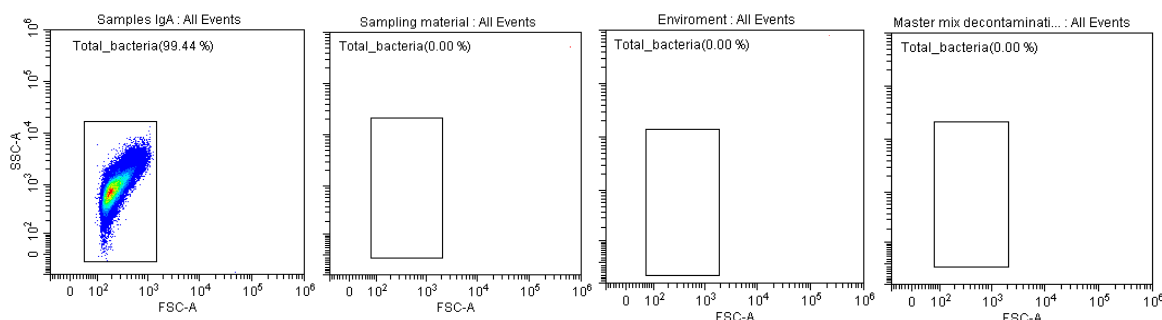


Figura 6. Ausencia de bacterias contaminantes en los controles ambientales. Análisis de citometría de flujo comparando, por tamaño y complejidad, a las bacterias presentes en una muestra problema, control de muestreo, tubo abierto y mezcla de PCR (de izquierda a derecha).

La ausencia de eventos en el área de tamaño y granularidad en los controles sugiere que las muestras fueron procesadas en condiciones escépticas, minimizando el problema de la contaminación cruzada.

6.2 Fracciones de bacterias decoradas con los subtipos de IgA

Para determinar la presencia de las subclases de IgA en las muestras analizadas, la primera parte consistió en la cuantificación de las subclases de IgA en las

diferentes muestras. La muestra de calostro presentó los mayores niveles de subclases de IgA, de los cuales, la IgA2 tuvo niveles ligeramente mayores que la IgA1 (Figura 7).

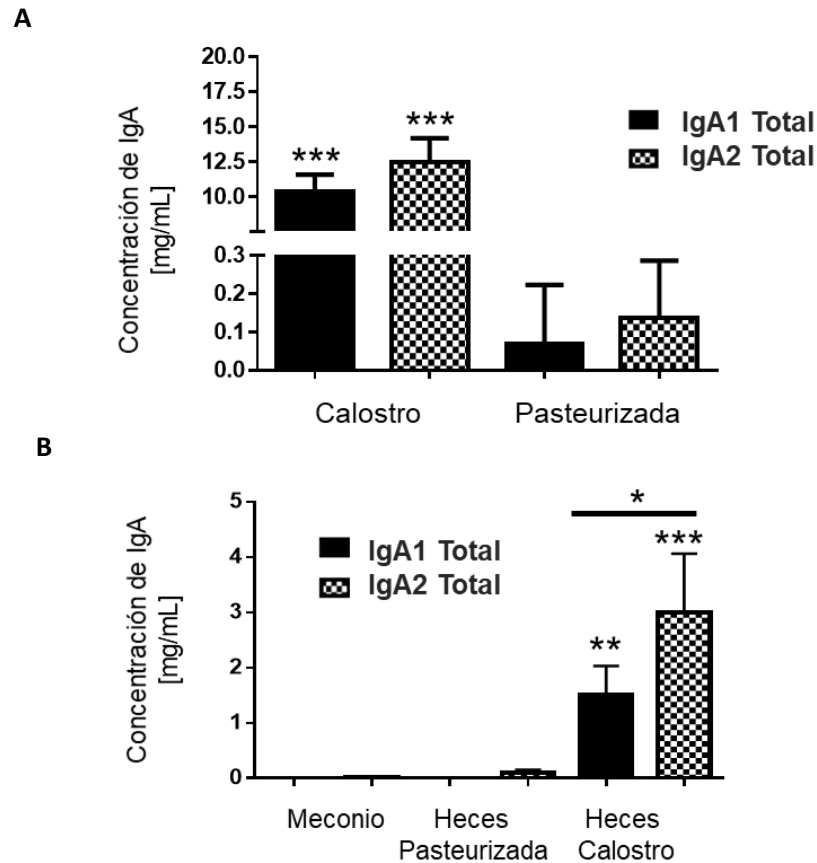


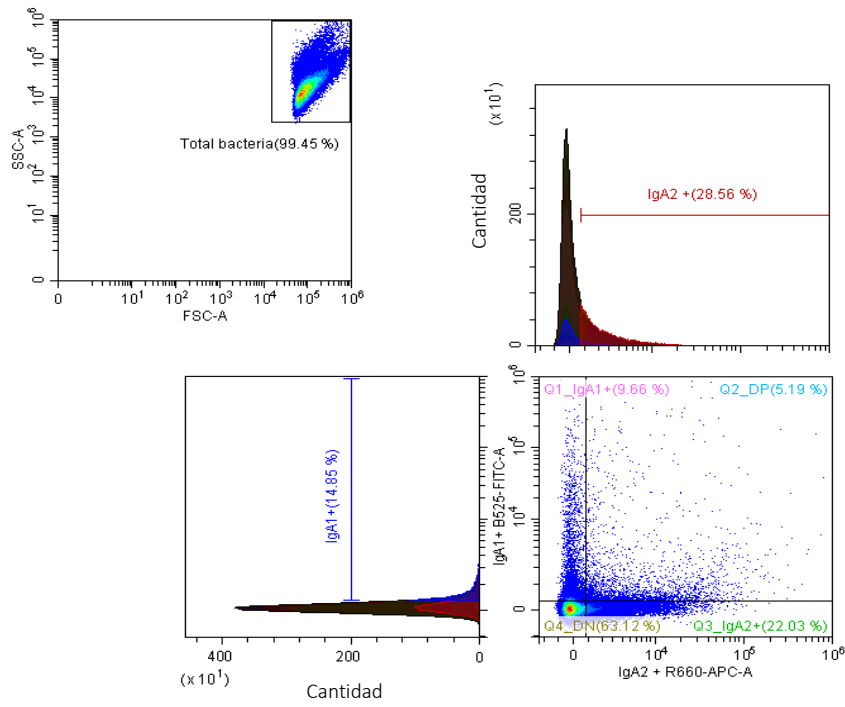
Figura 7. IgA2 es más abundante en calostro y heces A) Niveles de las subclases de IgA en las muestras de calostro, IgA1 (barras negras) e IgA2 (barras cuadros) y de muestras de formula láctea (n= 6). B) Niveles de subclases de IgA en muestras de meconio, y muestras de heces de neonatos alimentados con leche pasteurizada o con leche materna exclusiva. Cada barra representa el conjunto de las muestras analizadas (n=38). Todos los valores están representados como el promedio \pm la desviación estándar (SD). Los datos están expresados en mg de inmunoglobulina por mililitro / gramo de muestra.

Como se esperaría, en las muestras de meconio no se detectó ninguna de las subclases de IgA. Los datos mostraron que los niveles de subclases de IgA detectados en las muestras de heces obtenidas de neonatos alimentados con leche materna tuvieron los mayores niveles de IgA, en comparación con muestras de niños alimentados con fórmula (Figura 7B). Estos datos refuerzan el concepto de los efectos beneficiosos de una alimentación a temprana edad con la leche materna.

En una segunda etapa, las muestras fueron caracterizadas para determinar las bacterias totales asociadas con las subclases de IgA. Nuestros datos demostraron que cerca del 10 % de las bacterias presentes en calostro están decoradas por IgA1, mientras que el 20 %, están asociadas con IgA2 (Figura 8A). Nuestro análisis también demostró que un porcentaje considerable de estas bacterias se encuentran decoradas con ambos subtipos de IgA.

Al analizar el porcentaje de bacterias decoradas con los subtipos de IgA, los resultados indicaron que en las muestras de heces de neonatos alimentados durante los primeros tres días de vida con leche materna, un porcentaje de las bacterias recuperadas estaban asociadas exclusivamente con la IgA2 (Figura 8B). Este dato es interesante porque refuerza el concepto de que la IgA2 es la que participaría más efectivamente en la regulación y colonización de la microbiota comensal durante los primeros momentos de la vida. Esta función parece mantenerse durante toda la vida hasta la edad adulta, como ya se ha demostrado en otros trabajos (Sterlin y col., 2020).

A



B

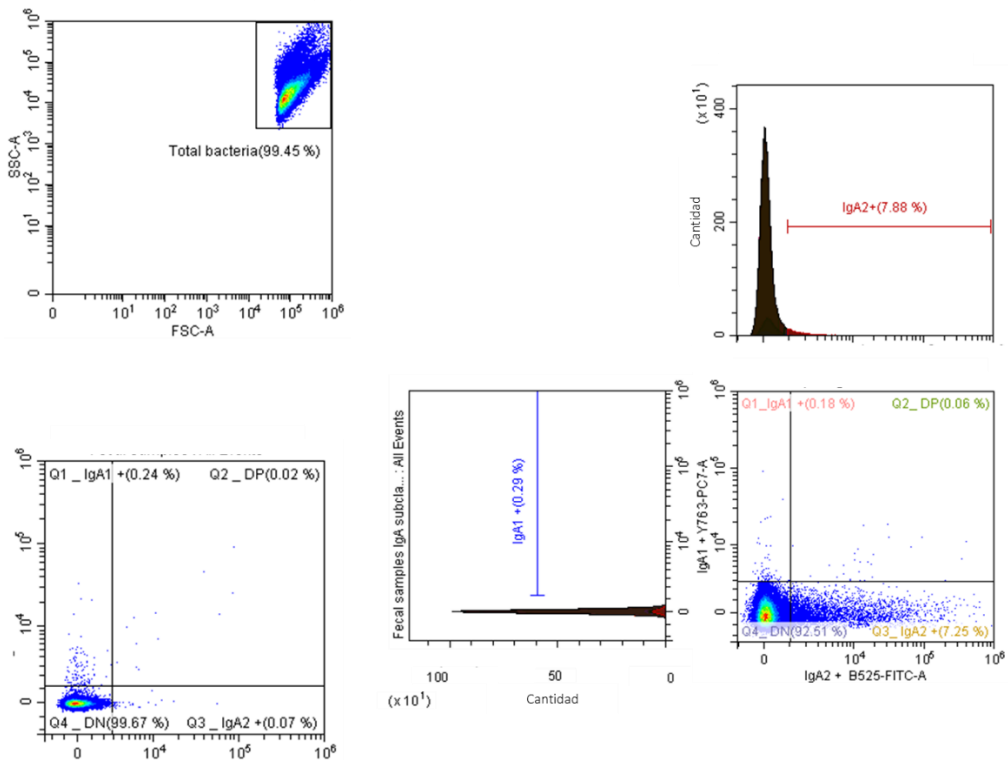


Figura 8. Estrategia del análisis por citometría en las fracciones de bacterias asociadas con las subclases de IgA A) en las muestras de calostro humano: bacterias totales (superior

izquierda), por su asociación para ambas subclases de IgA: IgA1 (izquierda) e IgA2 (arriba). B) Análisis para ambas subclases en muestras de meconio (inferior izquierda) y heces a los 3 días de vida de neonatos alimentados exclusivamente con leche materna (derecha) para la detección simultánea de bacterias asociadas a IgA1 e IgA2.

6.2 Construcción de genotecas para secuenciación por Ion Torrent

A partir de las fracciones de calostro y heces se extrajo DNA total y se sometió a electroforesis un gel de agarosa al 0.5 % para observar la integridad del DNA (Figura 9)

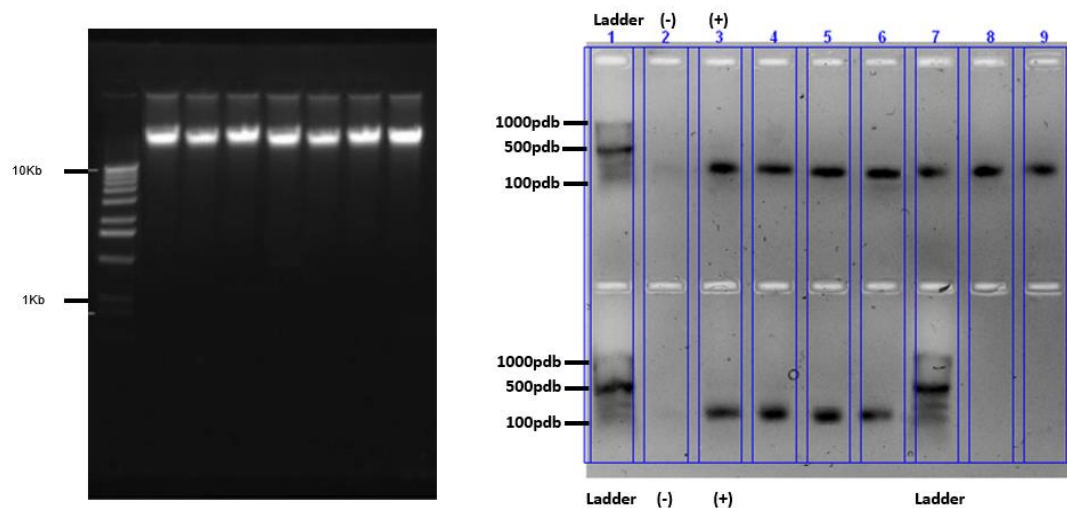


Figura 9. Imágenes representativas de geles de agarosa A) de DNA genómico de muestras de calostro y heces; y B) de los productos de PCR de la región V3 del gen 16S ribosomal (281 pdb). Ambos genes fueron teñidos con Midori Green.

Posteriormente se amplificó la región V3 del gen 16S ribosomal usando los cebadores V3 341F específicos por muestra (Anexos. Tabla 3) y V3 518 R para tener un producto de PCR de 281 pb (Figura 9). Con los productos de PCR se preparó una genoteca de DNA, mezclando cantidades equivalentes de todas las muestras y la mezcla fue secuenciada por secuenciación semiconductora de iones (ION Torrent).

6.3 Composición de la microbiota en el calostro en las muestras de heces de los neonatos con base en la abundancia relativa.

A partir de los datos generados de la secuenciación masiva se determinó la abundancia relativa de la microbiota a nivel de género en los tres grupos de muestras: calostro, fórmula y heces (Figura 10).

Entre las muestras de calostro no se encontraron diferencias significativas al nivel taxonómico de phyla ($p=0.68$). *Proteobacteria* y *Firmicutes* fueron los más abundantes, mientras que *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* se encontraron en menor proporción. Por su parte, en las muestras de heces de los lactantes se encontró un predominio de *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* y una menor frecuencia de *Bacteroidetes*, siendo estas proporciones significativamente diferentes a las observadas con el calostro ($p=0.014$).

En cuanto a la descripción por género, 13 géneros bacterianos fueron los predominantes en calostro y en las fracciones de los subtipos de IgA: *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Microbacterium*, la familia *Phylobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Kaistobacter*, la familia *Rhizobiaceae*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, la familia *Rhodobacteraceae*, *Propionibacterium*, las familias *Sphingomonadaceae* y *Xanthomonadaceae*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, la familia *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Microbispora*, la familia *Lachnospiraceae*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lachnospiraceae* y la familia *Phylobacterium*.

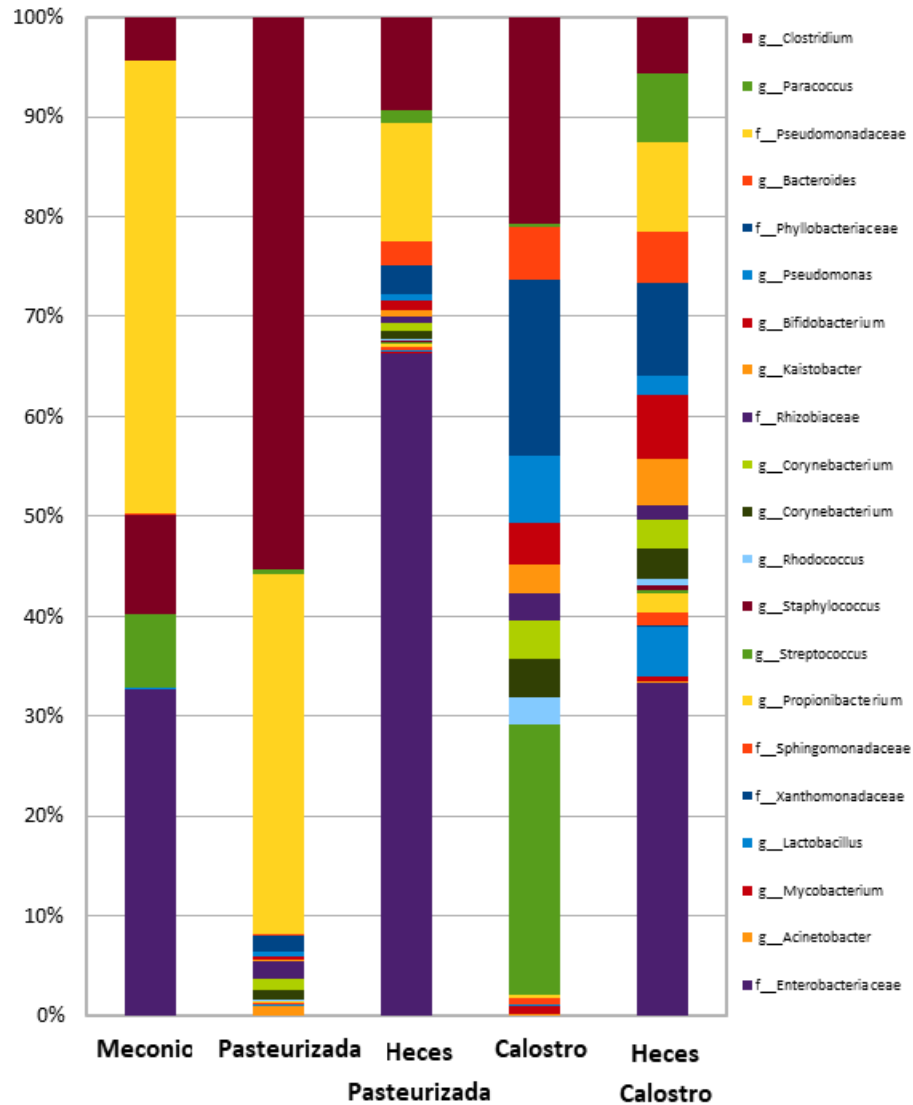


Figura 10. Comparación de la abundancia relativa de la microbiota entre los grupos estudiados de las muestras de calostro (fracción total, bacterias IgA1+ e IgA2+), muestra total de meconio, muestra de leche pasteurizada, fracción de heces de niños alimentados con leche pasteurizada y muestras de heces de niños alimentados con leche materna exclusiva durante los primeros tres días de vida (fracción total e IgA2+).

En muestras de meconio presentaron mayor presencia los géneros *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y la familia *Enterobacter*, mientras que en las muestras de fórmula se observó mayor abundancia de los géneros *Bifidobacterium* y *Streptococcus*. Finalmente, las muestras de heces de niños alimentados con leche materna y con formula no presentaron diferencias en su

composición bacteriana (*Clostridium*, *Streptococcus*, *Enterobacteria* y *Lactobacillus*). Sin embargo, al comparar las muestras de fracciones de IgA2, tanto para las bacterias del calostro y de heces de niños alimentados con leche materna exclusiva, fueron muy similares entre ellas (Figura 10).

6.4 Diversidad alfa de la microbiota en calostro y muestras de heces

Los análisis de diversidad alfa se usaron para cuantificar el número de especies bacterianas y su distribución dentro de cada muestra. A través del cálculo del número de OTUS observados y los índices de diversidad específica de Chao1, Shannon y Simpson. Con ellos se compararon las comunidades bacterianas presentes en los grupos de calostro y las fracciones (IgA1+ e IgA2+) y entre la fórmula y las muestras de heces de los neonatos (meconio, heces de niños alimentados con fórmula y heces de niños alimentados con leche materna, junto con la fracción de bacterias IgA2+). En nuestro análisis, el índice de diversidad de Chao reveló mayor riqueza bacteriana en las muestras de la fracción IgA2+ en las muestras de heces con respecto a las muestras de calostro, fórmula y heces (86% vs 81%, $P=0.03$ para la prueba no paramétrica de rangos de Wilcoxon) y una menor riqueza en las muestras de meconio. En lo que respecta al índice de Shannon, se encontraron mayores valores para las muestras de heces de niños alimentados con leche materna y de las muestras de calostro, a diferencia de las muestras de fórmula y meconio (Figura 11). Como se esperaba las muestras de meconio fueron las que presentaron mayores índices de dominancia, para el resto de las muestras no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

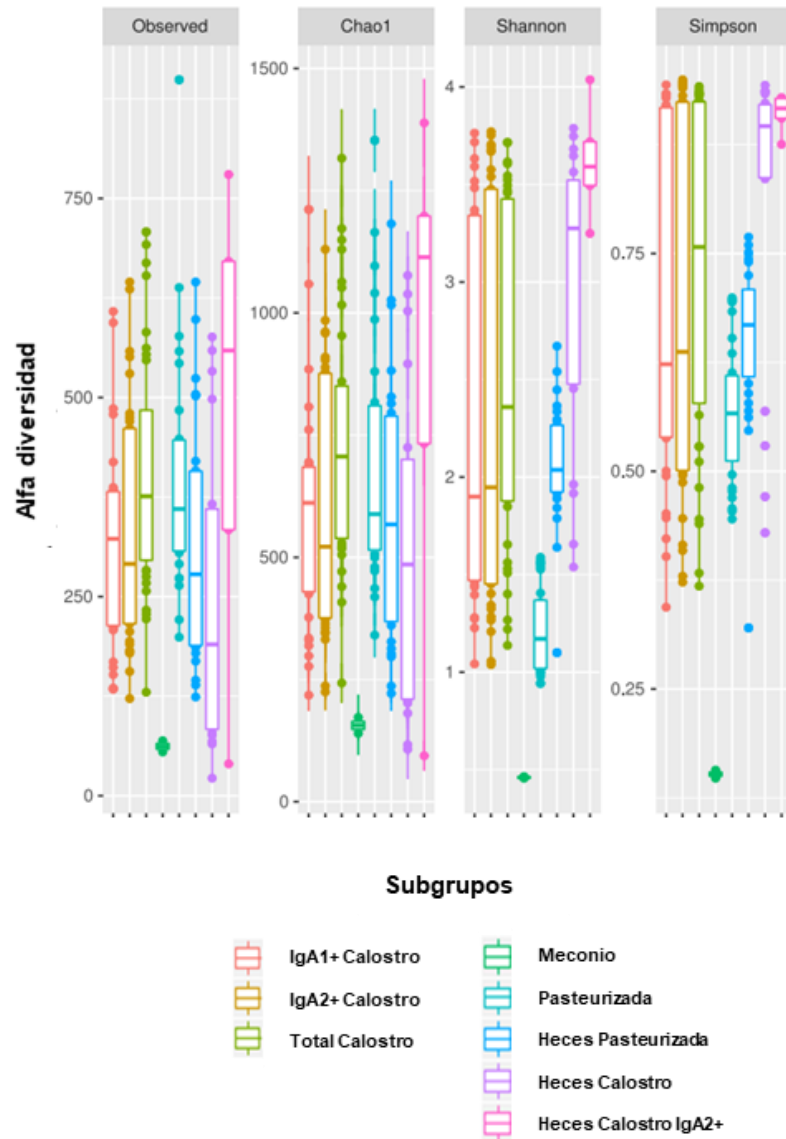


Figura 11. Distribución de las muestras analizadas según los índices de diversidad alfa, en las fracciones de calostro (bacterias decoradas con IgA1=IgA1+Calostro, decoradas con IgA2= IgA2+Calostro y bacterias totales=Total Calostro), Meconio, bacterias obtenidas de la leche pasteurizada (Pasteurizada) y muestras de heces a los tres días: bacterias totales de niños alimentados con leche pasteurizada (Heces Pasteurizada), fracciones de muestras de heces de niños alimentados con leche materna (Heces Calostro) y, de éstas, las bacterias decoradas con IgA2= Heces Calostro IgA2+; comparadas por el número de bacterias observadas (Observed) y de acuerdo a los índices de Chao1, Shannon y Simpson.

6.5 Diversidad beta de la microbiota en calostro y muestras de heces

La diversidad beta se utilizó para cuantificar y comparar el grado de diferenciación, también referido como distancia o similitud (análisis UniFrac) entre cada grupo de muestras. Para ello se calculó la distancia *Weighted UniFrac* entre las muestras pareadas para realizar el análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figura 12). El PCoA indicó una clara diferenciación entre las muestras de fórmula y las muestras de meconio y, a su vez, con las muestras de calostro y heces. De acuerdo con este comportamiento, se puede considerar a estos grupos como dos poblaciones microbianas separadas e independientes. Al analizar el comportamiento en las fracciones de subclases de IgA, se demostró que las fracciones IgA2+ de calostro y de heces de neonatos alimentados con leche materna son similares (ANOSIM: $P=0.051$). Mientras que la similitud entre las fracciones de IgA de calostro fue ligeramente similar entre ellas, como se demostró en un análisis de PCoA independiente (Figura 13).

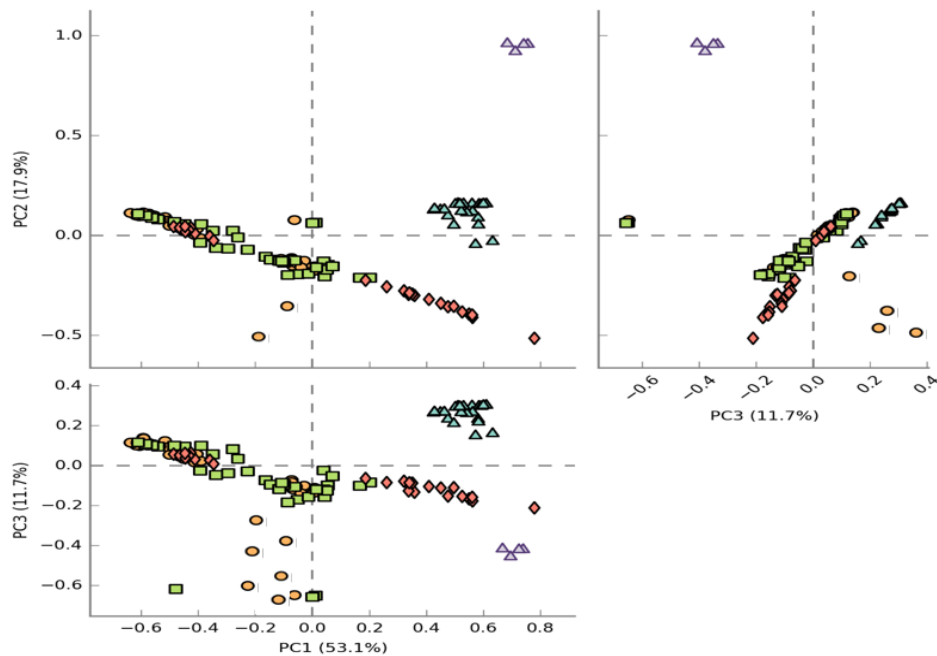


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCoA) del análisis beta. Se generaron diagramas de dispersión bidimensionales utilizando PCoA según la métrica de distancia UniFrac no ponderada. PC3 vs PC2, PC1 vs PC2 y PC1 vs PC3. Ambos grupos difirieron significativamente según la prueba de similitud ANOSIM ($R^2 = 0,289$, $p = 0,001$) y la prueba estadística de Adonis ($R^2 = 0,949$, $p = 0,001$). Las bacterias totales de los datos de meconio están presentes en triángulos azules; Las muestras de calostro están representadas en diamantes

rojos, las bacterias fecales IgA2 + de los recién nacidos alimentados con calostro en cuadrados verdes, las bacterias fecales de los recién nacidos alimentados con calostro en círculos amarillos y las bacterias totales de la leche pasteurizada en triángulos violetas.

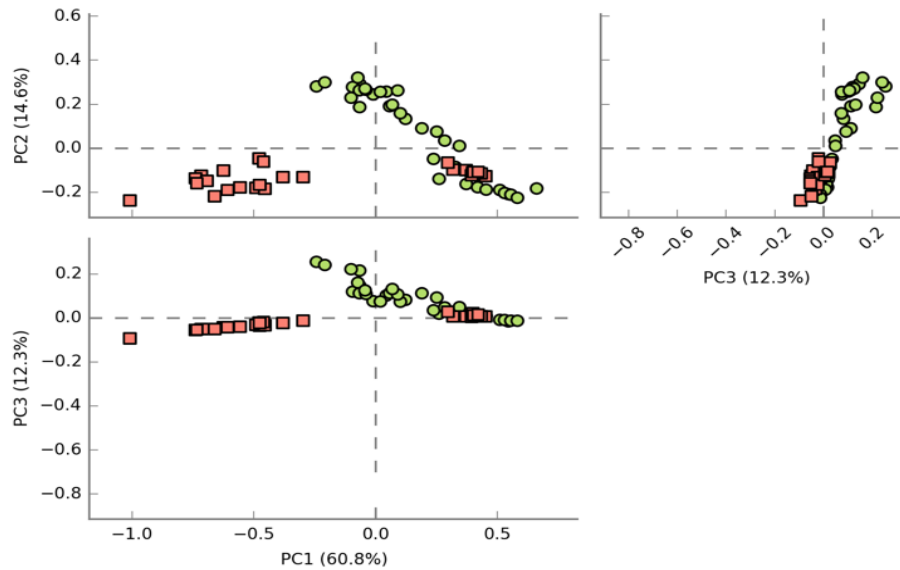


Figura 13. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de Análisis de diversidad beta. Se generaron diagramas de dispersión bidimensionales utilizando PCoA según la métrica de distancia UniFrac no ponderada. PC3 vs PC2, PC1 vs PC2 y PC1 vs PC3. Ambos grupos difirieron significativamente según la prueba de similitud ANOSIM ($R^2 = 0,289$, $p = 0,001$) y la prueba estadística de Adonis ($R^2 = 0,949$, $p = 0,001$). La fracción de IgA1 + se representa como puntos rojos y la fracción de IgA2 + como puntos verdes. Los gráficos anteriores representan datos de treinta y seis "Bacterias totales", treinta "Calostro IgA1 +" y treinta y tres muestras de "Calostro IgA2 +".

6.6 Diferencias taxonómicas en la microbiota de calostro y muestras de heces con base en el análisis de discriminación lineal LEfSe

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

En este trabajo se utilizó un punto de corte o umbral de significación para LDA de 2.0 para el análisis entre las fracciones de subclases de IgA en las muestras

de calostro, encontrándose que 6 grupos bacterianos, (3 asociadas con IgA1 y 3 asociadas con IgA2) fueron significativamente diferentes entre las fracciones (Figura 14).

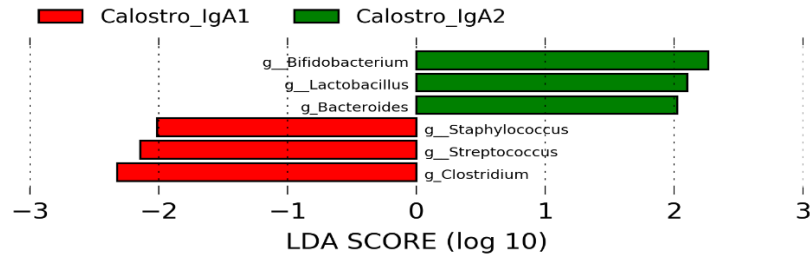


Figura 14. Comparación LEfSe (*Linear discriminant analysis effect size*) entre taxones bacterianos significativos ($p < 0.05$) para las fracciones de bacterias asociadas con los subtipos de IgA en muestras de calostro (IgA1+= rojo e IgA2+= verde) (LDA=2).

Para el análisis de bacterias asociadas con IgA2 en calostro y en heces de neonatos alimentados con leche materna, se utilizó un punto de corte para LDA de 3.5. Obteniendo como resultado que 24 grupos taxonómicos fueron significativos, 6 para el grupo de bacterias IgA2+ en el calostro y 18 para bacterias IgA2+ en heces (Figura 15).

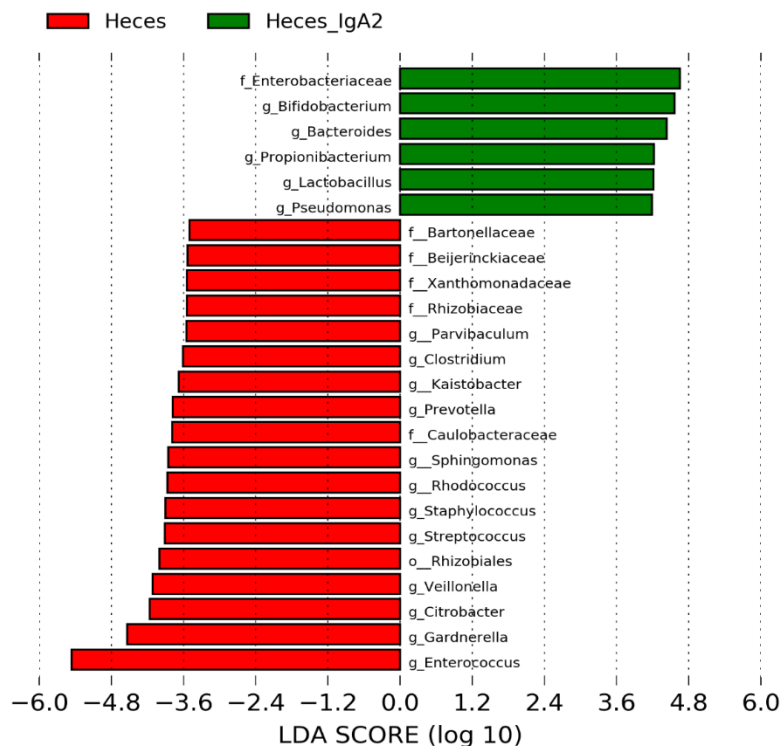


Figura 15. Diferenciación entre taxones bacterianos con valores de p y q significativos (<0.05) para fracciones de bacterias en muestra de heces a los tres días de neonatos alimentados exclusivamente con leche materna (Totales= rojo e IgA2+= verde (LDA=4.8) identificados mediante análisis de discriminación lineal (LEfSe).

6.7 Análisis de la asociación de diversidad de la microbiota con las rutas metabólicas en muestras de calostro y heces por PICRUS

Finalmente, se realizó un análisis de la asociación de la diversidad de la microbiota con rutas metabólicas, para ello se utilizó una herramienta estadística que emplea los datos de abundancia relativa contra la base de datos de Greengenes y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (PICRUS), para analizar cuáles rutas metabólicas podrían estar implicadas por las abundancias relativas de las bacterias presentes en las muestras y de esta manera examinar si existen disparidades en la composición bacteriana entre las fracciones IgA2+ de calostro y heces de neonatos alimentados exclusivamente con leche materna y heces de neonatos alimentados con fórmula.

El análisis de PICRUS identificó once vías metabólicas funcionales y mostró que, a pesar de la variación inter e intra individuales (diversidad alfa y beta) en la composición de la microbiota intestinal de los neonatos y de la leche fisiológica, las muestras poseen perfiles funcionales que se complementan.

En general, nuestro análisis reveló las mayores diferencias significativas para el proceso de invasión bacteriana a las células epiteliales entre las muestras de heces y la fracción IgA2+ con respecto a las muestras de neonatos alimentados por fórmula (Figura 16).

Las muestras de bacterias IgA2+ en heces de neonatos alimentados con leche materna mostraron incremento significativo de genes correspondientes al metabolismo de ácidos grasos, propionato, galactosa, triptófano, folato, fructosa y manosa mostraron una sobrerrepresentación en las muestras de heces en niños alimentados con leche materna ($p < 0.04$). De las cuales el metabolismo de folato tuvo la diferencia más significativa ($p = 1.31e-5$).

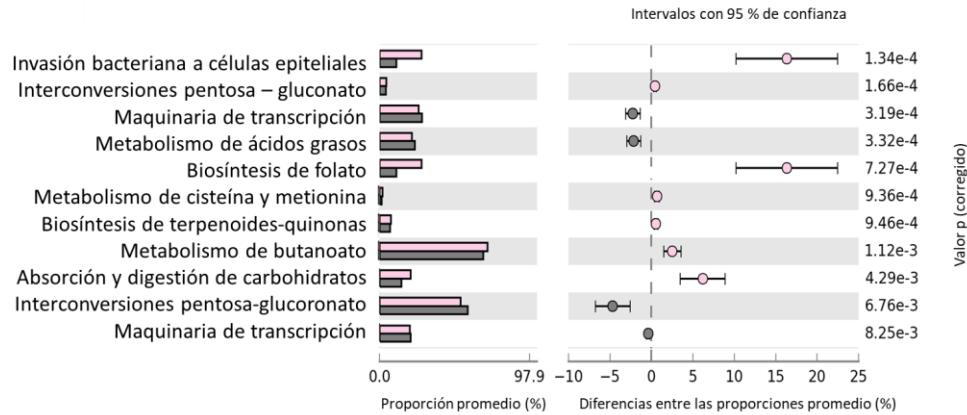


Figura 16. Variación funcional de las vías metabólicas. Las vías metabólicas microbianas entre las bacterias IgA2+ se enriquecen en factores de colonización intestinal y metabolismo activo de los carbohidratos. Análisis de *gene ontology* (GO) de las vías metabólicas más representativas en la predicción de vías metabólicas microbianas funcionales mediante el análisis PICRUSt (KEGG nivel tres). La abundancia de nueve vías metabólicas estadísticamente significativas entre cinco muestras de bacterias fecales IgA2+ de neonatos alimentados con calostro humano durante tres días, en color rosa; y veintisiete muestras de bacterias fecales IgA- de niños alimentados con leche pasteurizada, en gris. Todos los valores se representan como media \pm DE.

Puesto que nuestros resultados indicaron un enriquecimiento de los caminos metabólicos asociados a síntesis del folato, decidimos evaluar si, según lo publicado previamente, las subclases de IgA presentaron el reconocimiento diferenciado de una proteína común relacionada con estos caminos metabólicos como la enzima SHMT. Nuestros datos de WB sugieren que ambas subclases de IgA de calostro reconocen la SHMT, presente en ambas fracciones aisladas (IgA1+ e IgA2+) (Figura 17). Lo que indica que el reconocimiento de IgA por las bacterias presentes en calostro es dada por la asociación de la inmunoglobulina con antígenos comunes presentes entre diversos géneros bacterianos.

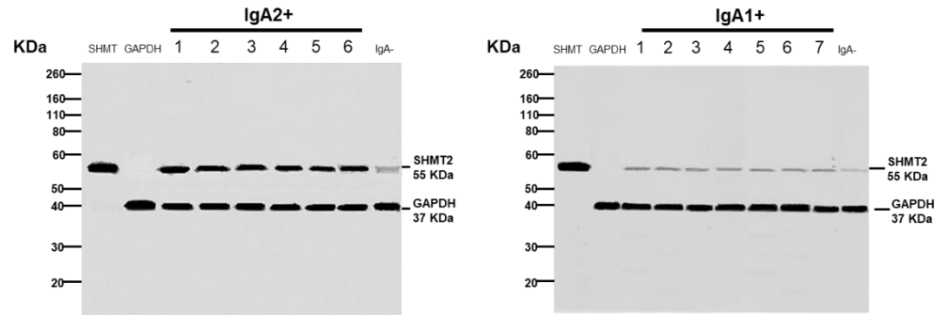


Figura 17. Análisis del reconocimiento de las subclases de IgA en calostro a la enzima de SHMT. Reactividades de seis extractos de células seleccionados al azar de bacterias IgA2+ (izquierda) y siete extractos celulares seleccionados al azar de bacterias IgA1+ (derecha) del calostro humano, titulados con números consecutivos. Las imágenes son representativas de tres repeticiones experimentales independientes.

En las muestras fecales la presencia de IgA1 del calostro fue nula, esto puede deberse en parte a la presencia de proteasas de origen bacteriano presentes en las muestras obtenidas y que, durante el tránsito intestinal del neonato, el cual dura alrededor de 48 horas (Bodé y col., 2004), la IgA1 está expuesta a procesos de degradación. Lo anterior se demostró con un ensayo realizado en el laboratorio (Figura 18) y los datos indicaron que dentro de los primeros veinte minutos la IgA1 expuesta a la fracción de bacterias ya no era detectable por el método de ELISA. Sugiriendo que, efectivamente las proteasas presentes en la muestra degradan a la IgA1.

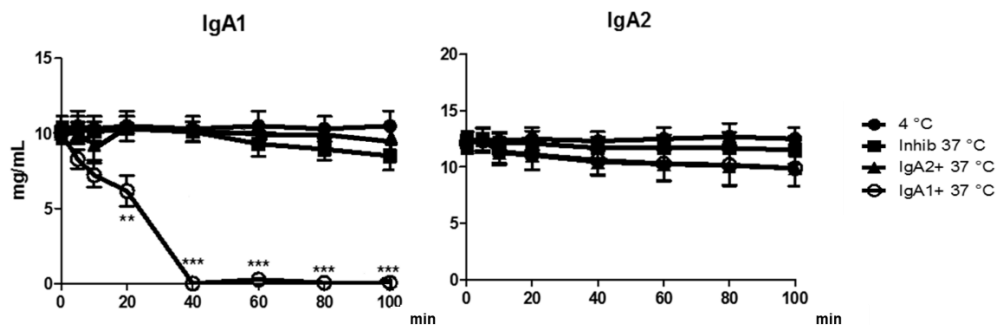


Figura 18. Las proteasas bacterianas degradan preferentemente la IgA1. Evaluación cinética de la estabilidad de IgA1 (izquierda) e IgA2 (derecha). Las subclases de IgA fueron incubadas con las fracciones de las bacterias de IgA2+ o de IgA1+ del calostro bajo dos diversas condiciones de la temperatura y en presencia o la ausencia de inhibidores de proteasa. La cantidad de IgA restante fue cuantificada por ELISA, y el tiempo se expresa en minutos. Cada punto indica la media \pm DE de triplicados técnicos de ocho muestras seleccionadas al azar.

7 Discusión

En este estudio describimos la composición filogenética de los géneros bacterianos asociados con las subclases de IgA presentes en el calostro humano y su posible impacto en el establecimiento de la primera microbiota en el recién nacido.

Los datos mostraron una gran cantidad de ambas subclases de IgA en el calostro humano. Estos niveles altos de IgA en un tejido linfoide terciario están regulados por las condiciones fisiológicas de la glándula mamaria. La regulación hormonal propia del embarazo permite que, por efecto de la progesterona, las células endoteliales de la mama expresen CCL25 y CCL28; y mayores niveles de MadCAM-1 (Gruber; 2004), durante los últimos meses del embarazo. Y al final de esta etapa, los estrógenos inducen un aumento de VCAM-1 (Klinge; 2001; Gruber; 2004) para que las células secretoras de anticuerpos IgA1 ($\alpha 4\beta 1+$) e IgA2 ($\alpha 4\beta 7+$), puedan arribar a la glándula y acumularse en el estroma cerca de los acinos mamarios durante el embarazo (Peate y col., 2017) y en la lactancia. Las células secretoras de IgA pueden residir por largos periodos de tiempo en nichos de supervivencia especializados (Kunkel & Butcher; 2003) (Seong y col., 2017) lo que permite su acumulación en la glándula mamaria.

Nuestros resultados indicaron que ambos subtipos de IgA se encuentran muy elevados en calostro, en comparación con las muestras de la fórmula láctea. La leche pasteurizada es una opción de alimentación suplementaria que, por consideración del pediatra, se recomienda cuando la lactación materna no es viable. Por ejemplo, ablactación, enfermedad materna que obligan a la separación del neonato, o impedimento por ingesta de fármacos.

La fórmula láctea se prepara con volúmenes de madres donantes de menos de siete días posparto, en el Banco de Leche del Hospital, la cual es pasteurizada (63 °C por 30 min) proporcionada al neonato, basándose en el cálculo de la capacidad gástrica (70 a 80 ml/Kg de peso del neonato) (Jiménez-García y col., 2014). El proceso de pasteurización induce la desnaturalización de los anticuerpos y afecta su capacidad de reconocimiento y asociación a su antígeno.

De acuerdo con los resultados, estos muestran una reducción importante en la detección de los niveles de IgA debidos, en gran medida, a este proceso de pasteurización (Chantry y col., 2011).

De las muestras del neonato, las heces obtenidas a los tres días de vida con alimentación por leche materna exclusiva, se recuperaron niveles considerables de ambos subtipos en comparación con niños alimentados por fórmula láctea. En comparación el meconio es una muestra obtenida en el momento en que el recién nacido aún no ha estado en contacto con la IgA materna y no será capaz de producir IgA secretora propia hasta los tres meses de vida (Brandtzaeg, 2013). Estos resultados concuerdan con estudios publicados, donde se había documentado el tránsito de la IgA materna por el tracto gastrointestinal del neonato y la recuperación de una menor cantidad de Ig en heces del neonato (Demers-Mathieu y col., 2019); incluso en las condiciones fisiológicas del cuerpo del recién nacido o por un efecto de almacenamiento de estas subclases a lo largo del tracto gastrointestinal del neonato o por probable degradación. Una posible explicación sería la presencia de proteasas bacterianas específicas de IgA1. La diferencia estructural más evidente entre los subtipos de IgA, es la presencia de una secuencia de 13 a 16 aminoácidos en la región de la bisagra de la IgA1, que es rica en residuos de prolina (Pro), serina (Ser) y treonina (Thr). La IgA1 es más susceptible a sufrir escisión por parte de proteasas de *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *S. sanguis* (Woof & Russell, 2011).

Las enzimas tienen una alta especificidad por la región bisagra de la IgA1 (Pro-Thr y Pro-Ser). La IgA2 presenta una región bisagra más corta y no contiene residuos ricos en Pro, Ser y Thr. Esto hace que la IgA2 sea más resistente a proteasas bacterianas en la luz de la mucosa.

Al igual que en estudios anteriores (Ladjeva y col., 1989), nosotros describimos la presencia de ambas subclases de IgA en el calostro humano. Sin embargo, de

acuerdo con nuestros datos, las subclases de IgA presentan un reconocimiento diferencial de los grupos de bacterias, en comparación con muestras de heces humanas (Sterlin y col., 2020):

Una posible explicación es que, el calostro contiene una menor cantidad de bacterias, en comparación con una muestra de heces en adulto. De acuerdo con los modelos propuestos en la literatura (Hoces y col., 2020) (Bunker & Bendelac, 2018), las subclases de IgA se asocian a los epítomos más inmunogénicos expresados en la superficie de las bacterias. La tasa de probabilidad de interacción IgA-microbiota disminuye ya que la población de microorganismos y diversidad de epítomos es mucho menor en comparación con la microbiota de una muestra de heces. Lo anterior podría explicar la distribución aparentemente diferencial entre las subclases de IgA. Esto sugeriría cierto nivel de especificidad por parte de la IgA durante la asociación de las subclases a los géneros bacterianos presentes.

Nuestros datos mostraron que ciertos géneros bacterianos presentes en el calostro son similares a los presentes en la microbiota intestinal (Chen y col., 2020). Recientemente, se demostró que la microbiota presente en intestino de individuos sanos tenían un patrón de reconocimiento entre las subclases de IgA: la mayoría de las bacterias IgA2+ estaban decoradas con la IgA1, sin embargo, un pequeño grupo de bacterias estaban asociadas en gran cantidad y exclusivamente a la IgA2+, lo cual fue sugerente de que, en una microbiota tan extensa y compleja como la intestinal los subtipos de IgA estaban compartiendo el reconocimiento de varios grupos de bacterias (*Bacteroidetes* y *Bifidobacterium*) del tipo comensal (Sterlin y col., 2020). Esta distribución se analizó en niños alimentados con fórmula y encontraron que solo la asociación con IgA2 se mantenía a los tres meses de edad. Lo cual concuerda con nuestros resultados. Las composiciones microbianas similares pueden explicarse ya que, de acuerdo con la literatura, las células productoras de anticuerpos residentes de la glándula mamaria lactante provienen del intestino. En el intestino delgado, el subtipo en mayor proporción es la IgA1, sin embargo, durante infecciones se sabe que la

proporción puede variar y aumenta de manera muy importante los niveles de IgA2 (Agace & Mc Coy; 2017; Tropini y col., 2017) por medio de la señalización inducida por APRIL (He y col., 2007). En el intestino grueso las células residentes expresan mayores niveles de CCL25 y APRIL en comparación con el intestino delgado (Bourges y col., 2008) (Shyer y col., 2015), los cuales facilitan de manera importante la diferenciación de células productoras de anticuerpo IgM+ a IgA1+, directamente de IgM+ a IgA2+ o de IgA1+ a IgA2+ (Fagarasan & Honjo; 2016; Chu y col., 2017).

En cuanto al patrón de reconocimiento de epítomos en la superficie de las bacterias de la microbiota, Ladjeva y col., en 1989 habían demostrado que el reconocimiento antigénico de los subtipos de IgA está diferenciado en el calostro humano (Ladjeva y col., 1989; Sánchez-Salguero y col., 2020). El reconocimiento de la IgA por antígenos de la microbiota se basa en dos mecanismos principales: la reactividad selectiva o dependiente de la fracción de unión al antígeno (Fab) y por reactividad cruzada o independiente de Fab por glicosilaciones de la fracción cristalizante (Fc). Sin embargo, la reactividad cruzada parece no tener gran participación en el reconocimiento de bacterias de la microbiota y se sugiere que depende más del reconocimiento dependiente del Fab (Kawamoto y col., 2012). Existen dos tipos de IgA, de acuerdo con la composición bioquímica del antígeno que reconocen: el primero se le conoce como IgA polirreactiva o natural: esta se produce, en su mayoría, por linfocitos B activados en respuesta a antígeno timo independientes o T independientes (Macpherson y col., 2016); que responden principalmente a microorganismos propios de la microbiota normal o comensales (Okai y col., 2016). Estos linfocitos también pueden migrar a otros tejidos del sistema inmunológico (Kunkel & Butcher; 2003), como la glándula mamaria (Lin y col., 2014) (Sánchez-Salguero y col., 2020):

La respuesta T independiente se lleva a cabo en los folículos linfoides aislados y en la lámina propia (LP) de las mucosas y no requiere la participación de las células T o la formación de los centros germinales (GC). Esta diferenciación se

induce por la señalización de IL-6, TGF- β , IL-5, IL-10 y ácido retinoico (AR) (Pabst y col., 2016). Este ambiente de citocinas aumenta la expresión de la IL-10 y el TGF β por las CD y los linfocitos Treg, para facilitar la diferenciación de los linfocitos B residentes a células plasmáticas productoras de IgA. El tipo conocido como IgA de baja afinidad o T independiente se considera que está más asociado a una respuesta contra las bacterias comensales residentes (Pabst y col., 2016). Al segundo tipo se le conoce como IgA específica, que es el producto de la respuesta a antígenos primordialmente de naturaleza proteica, también llamados timo-dependientes o T dependientes. Esta IgA es generalmente de alta afinidad y se considera de producción local por células plasmáticas residentes de lámina propia de las mucosas, principalmente de los sitios efectores (Kugelber; 2016) en respuesta a una infección o presencia de patobiontes o géneros bacterianos potencialmente patógenos en el tracto gastrointestinal.

Durante la respuesta T dependiente, las células dendríticas situadas por debajo de las células con micropliegues (células M), captan y procesan el antígeno, migran a la zona T del CG, donde activan a las células T residentes. Las células T CD4⁺ activadas expresan el receptor de quimiocina CXCR5 para migrar hacia un gradiente de CXCL13 en la red de las células dendríticas foliculares (FDC, por sus siglas en inglés). El linfocito B que ya ha reconocido a su antígeno a través del receptor de la célula B (BCR, por sus siglas en inglés), migra desde la zona folicular a la zona extrafolicular para la interacción con estas células T CXCR5⁺. Lo anterior permite la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas de vida corta.

Una porción de las células B CXCR5⁺ migra de regreso a la zona oscura del CG, para iniciar el proceso de proliferación e interactuar nuevamente, con las Tfh y FDC, mediante la reacción del CG en la zona clara y llevar a cabo los procesos de hipermutación somática (SHM, por sus siglas en inglés) y la reacción de cambio de isotipo (CSR, por sus siglas en inglés) (Macpherson, 2008). Esto permite su diferenciación a células plasmáticas de vida larga o a células B de memoria. La generación preferente de las células B IgA⁺ se regula por la

señalización del TGF- β 1, la IL-21, y el RA (Pabst y col., 2016). El aumento en la expresión de la proteína-1 inductora de maduración en linfocito B (Blimp1) y el factor regulador del interferón 4 (IRF4), permiten la diferenciación del linfocito B a plasmablasto y a una célula plasmática productora de IgA.

Sin embargo, la asociación de la IgA con la microbiota y su diferenciación entre géneros bacterianos no solo depende de la IgA. Hasta hace poco tiempo, Hoces y col sugirieron un posible mecanismo de asociación de la IgA con la microbiota, considerando las variables más importantes de la microbiota: El modelo de encadenamiento condicionado (Hoces y col., 2020) sugiere que la asociación de la IgA de baja afinidad (T independiente) permite generar complejos o comunidades de bacterias comensales en el intestino, las cuales se encuentran en grandes cantidades; mientras que una IgA de alta afinidad (T dependiente) en bacterias potencialmente patógenas condicionaría su interacción con las células del epitelio intestinal y ayudaría al proceso de aclaramiento de éstas. Probablemente este sea el origen de la IgA (IgA1 e IgA2) que, de forma homeostática, la madre provee a su hijo.

Como en otros estudios previos, nosotros demostramos que el calostro contiene aproximadamente 1×10^6 bacterias por mililitro e incluye 200 especies y 50 géneros bacterianos diferentes. Se caracteriza por *Firmicutes*, que incluye a los géneros de *Anaerococcus*, *Coprococcus*, *Enterococos*, *Clostridia*, *Macrooccus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Veillonella* (Bunker & Bendelac, 2018); *Actinobacteria*, con los géneros de *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcos*, *Rhodococcus* y *Propionibacterium*; *Proteobacteria*, incluyendo a *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Moraxella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Pseudomona*, *Providencia*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Proteus*; y *Bacteroidetes*, con *Bacteroides*, *Flavobacterium* y *Prevotella*.

Nuestros datos mostraron un mayor enriquecimiento de bacterias del género *Bifidobacterium* *Clostridium* y *Lactobacillus* en muestras de heces de niños alimentados exclusivamente por leche materna. La gran cantidad de los

microorganismos residentes propios de la microbiota humana requiere que el sistema inmunológico asociado a las barreras epiteliales, conocido como el tejido linfoide asociado a las mucosas (TLAM) (Brandtzaeg, 2013), sea capaz de reconocerlos; proteger al cuerpo contra patógenos potenciales y, al mismo tiempo, establecer los mecanismos de tolerancia necesarios frente a los microorganismos comensales (Nabhani y col, 2019).

Por estudios en pacientes con inmunodeficiencia selectiva de IgA (Fadlallah y col., 2018), se sabe que esta inmunoglobulina tiene un papel importante en el mantenimiento de cierto tipo de microorganismos comensales en el intestino. En estos estudios se demostró que las bacterias *E. ramosum*, *Acinetobacter*, *H. parainfluenza*, *E. coli*, *S. sanguinis*, *Clostridia*, *Prevotella*, *Bacteroidetes* y *Eubacteria*; aumentaban su crecimiento en ausencia de la IgA del intestino; mientras que los géneros de *Lactrospiracea*, *Clostridia*, *Ruminococcus*, *Eubacteria* y *Firmicutes*, se encontraban disminuidos en comparación con los individuos sanos.

La interacción temprana con los microorganismos parece tener una función importante en el desarrollo del sistema inmunológico del bebé. Durante los primeros días de vida, leche materna contiene grandes cantidades de factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés). Este factor puede interactuar con las células caliciformes en el epitelio intestinal, que expresan el receptor del EGF (EGFr) (Knoop y col., 2020). Esta interacción inhibe la formación de los pasajes asociados a las células caliciformes, al bloquear la expresión del receptor de acetilcolina en la cara basolateral de las células; generando una exposición controlada de antígenos comensales, que provienen de la primera microbiota del recién nacido (Kulkarni y col., 2020). Induciendo la proliferación de poblaciones Treg en la lámina propia. Estableciendo así, una respuesta de tolerancia a estas especies bacterianas.

Durante la maduración de la leche materna, los niveles de EGF disminuyen y permiten el transporte de antígenos vía GAPs. Las bacterias y sus antígenos transportados inducirán una respuesta de tolerancia en el intestino del recién

nacido, hasta el incremento considerable, en abundancia y riqueza, de su propia microbiota; el cual, se ha descrito como el segundo mecanismo de regulación de la expresión de GAPs (Kulkarni y col., 2020).

Gómez de Agüero y colaboradores (Gómez de Agüero y col., 2016) utilizaron ratones hembra libres de patógenos infectados con la cepa de *Escherichia coli* HA107E durante su embarazo. Ellos demostraron que, la interacción durante el embarazo estaba relacionada con un aumento en el número de las células de tipo innato 3 y de las células mononucleares CD11c+ F4/80+, una mayor producción de moco intestinal por las células caliciformes, un aumento en la expresión del receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR, por sus siglas en inglés) por las células epiteliales, y una mayor secreción de la inmunoglobulina A (IgA); en el intestino de las crías.

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que, los niños nacidos por vía cesárea presentan una variación en la composición de su microbiota, caracterizada por presentar una disminución en la abundancia relativa del género *Bifidobacterium* y un incremento en géneros *Clostridium* y *Streptococcus*, en comparación con los niños nacidos por vía vaginal. Esto está relacionado con una mayor susceptibilidad a desarrollar problemas alérgicos y enfermedades inflamatorias en el intestino durante su vida futura (Urbaniak y col., 2012).

Las especies del género *Bifidobacterium*, *B. lactis* y *B. longum* producen, a partir del metabolismo de fermentación de polisacáridos complejos presentes en la dieta, a los ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés) como el butirato, el acetato y el propionato (Chen y col., 2020). Estos metabolitos son captados por el receptor de niacina acoplado a proteína G 109a (GPR109a), expresado en la superficie de las células epiteliales. La interacción de los SCFA con el receptor GPR109a, promueve la síntesis de interleucina (IL) 18 y la producción de péptidos antimicrobianos como la proteína 3 gamma derivada de regeneración, por las células de Paneth de intestino delgado, la proteína 3 beta derivada de regeneración por las células del intestino grueso y la producción del

moco por aumento en la síntesis de la mucina 2 en las células caliciformes (Gómez de Agüero y col., 2016; Knoop y col., 2017).

El género *Bifidobacterium* también participa en el aumento de la expresión de moléculas en las uniones estrechas como la proteína 1 de la zona ocludens y la cadherina de las células epiteliales, a través de dos mecanismos: El primer mecanismo consiste en la síntesis bacteriana del triptófano a partir del indol. El triptófano estimula un aumento en la expresión del receptor nuclear X del pregnano. El receptor de pregnano (PXR), también conocido como nr112 (nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2) es un factor de transcripción relacionado con la regulación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (NFκB, por sus siglas en inglés). En el segundo mecanismo, el metabolismo del butirato afecta el consumo de oxígeno epitelial, induciendo un medio hipóxico y estabilizando al factor inducible por hipoxia 1 (Gómez de Agüero y col., 2016; Sánchez-Salguero & Santos-Argumedo, 2018). Algunas especies de *Clostridium*, actúan de manera importante en las fases finales del metabolismo de los ácidos biliares como la taurina. Estos metabolitos presentan actividad antimicrobiana haciendo a la membrana celular de las bacterias más lábil a los factores externos. La taurina también puede unirse al receptor de los farnesoides, expresado en células epiteliales, para regular la actividad del componente del inflamosoma NLRP6 y la producción de la IL-18. Lo anterior resulta en un aumento en la síntesis de los péptidos antimicrobianos por las células epiteliales (Gómez de Agüero y col., 2016; Demnelmair y col., 2020). El género *Lactobacillus* estimula la producción de la IL-22, a través de la señalización del receptor de los arilhidrocarburos expresado en las células dendríticas. La presencia de esta interleucina en la lámina propia promueve la diferenciación de los linfocitos B a las células plasmáticas productoras de IgA (Bunker & Bendelac, 2018).

Los géneros *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y algunas especies de *Clostridium*, sintetizan propionato en la luz del intestino. La interacción del propionato con el

receptor libre de los ácidos grasos 2, expresado en los linfocitos T vírgenes, promueve la diferenciación de los linfocitos T reguladores (Treg) en los tejidos epiteliales. La activación de la vía de señalización río abajo de GPR43, promueve la expresión de la proteína caja forkhead 3 (Foxp3), factor de transcripción que regula la expresión de los genes relacionados con la diferenciación al fenotipo Treg (Knoop y col., 2017).

La microbiota también tiene un papel muy importante en la estimulación de la respuesta adaptativa en los tractos epiteliales: Las células dendríticas, que fueron activadas por la interacción con los microorganismos, producen a la IL-12 para la diferenciación de los linfocitos T CD4+ cooperadores tipo 1 (Th1, por sus siglas en inglés), la producción de la IL-23 y la IL 1 beta para estimular a las células ILC-3. Las células ILC-3 secretan a la IL-17 para la diferenciación de los linfocitos T CD4+ cooperadores tipo 17 (Th17, por sus siglas en inglés). Los Th17 producen a la IL-17A y la IL-22 que estimulan la producción de péptidos antimicrobianos por las células epiteliales (Agace & McCoy, 2017).

El polisacárido A de *Bacteroides fragilis*, una especie que pertenece al género *Bacteroides*, interacciona con el receptor tipo Toll 2 (TLR-2) en la superficie de las células dendríticas. La CD aumenta la producción de la IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés) para la diferenciación de las células Treg y de las células plasmáticas productoras de IgA (Agace & McCoy, 2017).

La presencia de los *bacilos filamentosos segmentados (BFS)* en el intestino, está relacionada con la formación de los tejidos linfoides terciarios y la inducción de la respuesta inmunológica contra las bacterias patógenas en el intestino, a través de la producción local de IgA y la diferenciación de los linfocitos Th17 residentes de la lámina propia (Bunker y Bendelac, 2018).

La microbiota también participa directamente en la regulación de la respuesta inmunológica, al generar moléculas que suprimen los mecanismos de defensa, como el péptido parecido a la melanocortina 1. Este péptido, a través de la interacción con su receptor, inhibe la actividad del NF κ B y la producción de

citocinas proinflamatorias locales (Chen y col., 2020) (Bunker y Bendelac, 2018; Chen y col., 2020).

De acuerdo con nuestros datos, la ruta metabólica mayormente representada es la síntesis de folato. Okai S y col., determinaron que, en el intestino de ratón, las bacterias que expresaban la enzima serin hidroximetil transferasa (SHMT), son reconocidas por la IgA. Sugiriendo que el reconocimiento de diferentes géneros bacterianos por la inmunoglobulina se debe al reconocimiento de antígenos comunes expresados en la superficie de las bacterias (Okai y col., 2016).

Estos resultados proveen evidencia para entender el efecto de la interacción de la IgA2 en el establecimiento de la microbiota en el intestino del neonato. Por supuesto que la lactancia materna no es la única fuente de microbiota en los primeros días de vida. Pero de acuerdo con nuestros resultados la IgA2 tiene un papel activo en este proceso. El establecimiento de una microbiota adecuada durante los primeros días de vida ayudará a la maduración de la respuesta inmunológica intestinal. Sin embargo, se requieren estudios funcionales y en modelos animales para comprobar que esta asociación tiene una relevancia biológica y un efecto benéfico en la salud del neonato.

8. CONCLUSIONES

La composición de la microbiota de IgA2 se comparte entre el calostro y las muestras fecales del recién nacido. Estos resultados sugieren una contribución a la formación de la composición de la microbiota neonatal en el intestino por su asociación con bacterias principalmente del calostro. Esta asociación con la IgA2 sugiere una ventaja evolutiva para estas bacterias, al menos durante los primeros tres días de vida. Los grupos de bacterias recubiertas con IgA2 muestran perfiles metabólicos que pueden inducir y controlar la microbiota posterior, sugiriendo un papel activo de esta asociación IgA2-microbiota más allá de los primeros días de vida.

9. PERSPECTIVAS

1. Utilizar un modelo animal para evaluar el efecto del establecimiento de la microbiota asociada con la IgA2 y su efecto en el intestino del neonato.
2. Analizar los cambios en la diversidad de la microbiota durante los primeros 2 años de vida del infante y el papel que tiene la IgA2 en el proceso.

10.REFERENCIAS

1. Agace W, McCoy K (2017) Regionalized development and maintenance of the intestinal Adaptive immune landscape. *Cell press*. 46(4):532-548
2. Bodé S et al. (2004) Gastric emptying and small intestinal transit time in preterm infants: a scintigraphic method. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 39: 378-382
3. Bourges D, Meurens F, Berri M, Salmon H, Zanillo G, Levast B, Melo S, Gerdtz V (2008) New insights into the dual recruitment of IgA(+) B cells in the developing mammary gland. *Molecular Immunology* 45(12):3354-62.
4. Brandtzaeg P (2010) The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr*. 156(2 Suppl):S8-S15
5. Brandtzaeg P (2013) Secretory IgA: designed for anti-microbial defense. *Frontiers in immunology*. 4(222):1-17.
6. Brisken C, O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor Perspectives in biology*.w(12):a003178.
7. Bunker J et al (2015) Innate and adaptive humoral responses coat distinct commensal bacteria with immunoglobulin A. *Immunity*. 15;43(3):541-53
8. Bunker J and Bendelac A (2018) IgA responses to microbiota. *Immunity*. 49(2):211-224
9. Chantry C et al. (2011) Effect of flash-heat treatment on antimicrobial activity of breastmilk. *Breastfeeding medicine*. 6(3): 111-116
10. Chen K et al. (2020) Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. *Nature Reviews Immunology*
11. Chu D, Ma J, Prince A, Antony K, Seferovic M, Aagaard K (2017) Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature Medicine*. 23: 314-326
12. Demers-Mathieu V et al. (2019) Differences in maternal immunoglobulins within mother's own breast milk and donor breast milk and across digestion in preterm

infants. *Nutrients*. 11(920):1-14

13. Demirjian A, Levy O (2009) Safety and efficacy of neonatal vaccination. *Eur J Immunol*. 39(1):36-46.
14. Demmelmair H et al. (2020) Maternal and perinatal factors associated with the human milk microbiome. *Curr Dev Nutr*; 4(4): nzaa027
15. Fagarasan S, Honjo T (2016) Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol*. 3(1): 63-72.
16. Fadlallah J et al (2018) Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency. *Science Translational Medicine*. 10(439):eaan1217
17. García-Mena J et al (2016) Airborne bacterial diversity from the low atmosphere of Greater Mexico City. *Microb Ecol*. 72(1):70-84
18. Gómez de Agüero M et al (2016) The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science*. 351(6279):1296-1302
19. Gruber C, Gruber D, Gruber I, Weiser F, Huber J (2004) Anatomy of the estrogen response element. *Trends endocrinol metab* 15(2):73-78
20. He B, Xu W, Santini P, Poludorides A, Chiu A, Estrella J, Shan M, Chadburn A, Villanacci V, Plebani A, Knowles D, Rescigno M, Cerutti A (2007) Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A (2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*. 26(6):812-826
21. Hoces D et al. (2019) Growing, evolving and sticking in a flowing environment: understanding IgA interactions with bacteria in the gut. *Immunology*. 159:52-62
22. Hoffman W, Lakkis F, Chalasani G (2016) B cells, Antibodies, and More. *Clon J AM Soc Nephrol*. 11(1):137-154
23. Jiménez-García G et al. (2014) Alimentación con fórmula de inicio a libre demanda contra capacidad gástrica durante el periodo de transición. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 71(4):211-217
24. Kawamoto S et al. (2012) The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* 336, 485-489
25. Klinge C (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements.

Nucleic acids res. 15;29(14):2905-2919

26. Knoop K et al (2017) Microbial antigen encounter during a preweaning interval is critical for tolerance to gut bacteria. *Sci Immunol.* 15;2(18)
27. Knoop K et al (2020) Maternal activation of the EGFR prevents translocation of gut residing pathogenic *Escherichia coli* in a model of late-onset neonatal sepsis. *Proc Natl Acad Sci.* 7;117(14):7941-7949
28. Korpela K and de Vos V (2018) Early life colonization of the human gut: microbes matter everywhere. *Curr Opin Microbiol.* 44:70-78.
29. Kugelber E (2016) Searching for the antibody producers. *Nature Milestones Antibodies.* S7
30. Kulkarni D et al. (2020) Goblet cell associated antigen passages support the induction and maintenance of oral tolerance. *Mucosal immunol* 13(2):271-282
31. Kunkel E, Butcher E (2003) Plasma cell-Homing. *Nature Reviews* 3:822-829
32. Ladjeva I et al (1989) IgA subclasses of human colostral antibodies specific for microbial and food antigens. *Clin Exp Immunol* 78(1):85-90
33. Lin M, Du L, Brandtzaeg P, Pan-Hammarström Q (2014) IgA subclass switch recombination in human mucosal and systemic immune compartments. *Mucosal immunology.* 7;511-520.
34. Low E, Zagieboylo L, Martinoa B, Wilson E (2010) IgA ASC accumulation to the lactating mammary gland is dependent on VCAM-1 and alpha4 integrins. *Mol. Immunol.* 47(7-8):1608-1612.
35. Macpherson A (2008) The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 1(1):11-22
36. Macpherson A, Köller Y, McCoy K (2016) The bilateral responsiveness between intestinal microbes and IgA. *Trends in immunology.* 36(8):460-470
37. Moossavi S et al. (2019) Composition and variation of the human milk microbiota are influenced by maternal and early-life factors. *Cell host microbe.* 13;25(2):324-335.e4
38. Nabhani Z et al. (2019) A weaning reaction to microbiota is required for resistance

to immunopathologies in the adult. *Immunity* 5(21):1276-1288

39. Nagpal R et al. (2018) Gut microbiome and aging: physiological and mechanistic insights. *4*:267-285
40. Niewiesk S (2014) Maternal antibodies: Clinical Significance, Mechanism of Interference with Immune Responses, and Possible Vaccination Strategies. *Front Immunol.* 2014; 5: 446. Published online 2014 Sep 16. doi: 10.3389/fimmu.2014.00446
41. Okai S, Usui F, Yokota S, Hori-I Y, Hasegawa M, Nakamura T, Kurosawa M, Okada S, Yamamoto K, Nishiyama E, Mori H, Yamada T, Kurokawa K, Matsumoto S, Nanno M, Naito T, Watanabe Y, Kato T, Miyauchi E, Ohno H, Shinkura R (2016) High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. *Nature microbiology.* 1(9):16103. Doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.103.
42. Pabst O and Slack E (2020) IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. *Mucosal immunology.* 13: 12-21
43. Pabst O, Cerovic V, Hornef M (2016) Secretory IgA in the coordination of establishment and maintenance of the microbiota. *Cell Press Trends immunol.* 37 5: 287-296
44. Palm N et al (2014) Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* 2; 158(5):1000-1010
45. Pakkanen S, Kantele J, Moldoveanu Z, Hedges S, Häkkinen M, Mestecky J, Kantele A (2010) Expression of homing receptors on IgA1 and IgA2 plasmablasts in blood reflects differential distribution of IgA1 and IgA2 in various body fluids. *Clin Vaccine Immunol.* 17(3):393-401.
46. Peate M, Lesley S, Martha H (2017) Fertility after breast cancer and strategies to help women achieve pregnancy. *41(1)*:32-39.
47. Sánchez-Salguero & Santos-Argumedo (2018) Human microbiota association with immunoglobulin A and its participation in immune response. *Revista Alergia Mex.* 65(23)
48. Sánchez-Salguero et al. (2019) Infectious episodes during pregnancy, at

particular mucosal sites, increase specific IgA1 or IgA2 subtype levels in human colostrum. *Maternal Health Neonatology and Perinatology*. 5(9)

49. Sánchez-Salguero et al. (2020) Antigenic stimulation during pregnancy modifies specific IgA1 and IgA2 subclasses in human colostrum according to the chemical composition of the antigen. *Clin and Trans Investig*.
50. Selma-Royo M et al (2019) Shaping microbiota during the first 1000 days of life. *Probiotics and Child gastrointestinal health*. 1125:3-24
51. Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol*. 19;14(8):e1002533.
52. Seong Y, Lazarus N, Sugherland L, Habtezion A, Abramson T, He X, Greenberg H, Butcher E (2017) Trafficking receptor signatures define blood plasmablasts responding to tissue-specific immune challenge. *JCI insight*. 2(6):e90233.
53. Shyer A, Huycke T, Lee C, Mahadevan L, Tabin C (2015) Bending gradients: how the intestinal stem cells gets it home. *Cell press*. 161(3):569-580
54. Sterlin D et al. (2020) Human bind a diverse array of commensal bacteria. *JEM* 217(3):e2018163501152020c.
55. Strugnell R, Wijburg O (2010) The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol*. 8 9: 656-667.
56. Tropini C, Earle K, Huang K, Sonnenburg J (2017) The gut microbiome: connecting spatial organization to function. *Cell press*. 21(4):433-442
57. Urbaniak C et al. (2014) Microbiota of human breast tissue. *Appl Environ Microbiol*. 80(10):3007-3014
58. von Mutius E (2017) The shape of the microbiome in early life. *Nature Medicine* 23, 274–275 (2017) doi:10.1038.
59. Wang S et al (2020) Maternal vertical transmission affecting early-life microbiota development. *Trends in microbiology*. 28(1):28-45
60. Woof J & Russell M (2011) Structure and function relationships in IgA. *Mucosal immunology*.4 6:590-597.

11. ANEXOS

11.1 Cuestionario clínico del expediente de la madre

PROTOCOLO

"Cuantificación de IgA1 e IgA2 en calostro y su asociación con el número de enfermedades infecciosas durante el embarazo en diferentes compartimientos del SIM"

Nombre de la madre: _____

Edad de la madre: _____

Expediente de la madre: _____

Considerando los últimos 6 meses de su embarazo, coloque un **círculo** sobre su respuesta e indique el número de veces en las ocurrió el padecimiento.

Infecciones de vías respiratorias altas y bajas

			No. de veces
Faringitis	Si	No	#
Laringitis	Si	No	#
Sinusitis	Si	No	#
Otitis aguda media	Si	No	#
Bronquitis	Si	No	#
Neumonía	Si	No	#

Infecciones Gastrointestinales

			No. de veces
• Diarrea	Si	No	#
• Infecciones por parásitos:	Si	No	#
<i>Gardia lamblia</i>	Si	No	#
Amibiasis	Si	No	#
Otros	Si	No	#

¿Cuáles?

			No. de veces
• Gastroenteritis infecciosa	Si	No	#
<i>Salmonella</i>	Si	No	#
<i>E. coli</i>	Si	No	#
<i>Brucella</i>	Si	No	#
<i>Campilobacter</i>	Si	No	#
• Enfermedad celiaca	Si	No	#

Infecciones Urogenitales

			No. de veces
Infecciones de vías urinarias	Si	No	#
Cistitis	Si	No	#
Pielonefritis	Si	No	#

Infecciones en la piel

			No. de veces
Micosis cutánea	Si	No	#
Infecciones bacterianas en la piel	Si	No	#
Pénfigo	Si	No	#

Vitiligo	Si	No	#
----------	----	----	---

Enfermedades autoinmunes

• Sistémicas

	No. de veces		
Artritis reumatoide	Si	No	#
Lupus Eritematoso Sistémico	Si	No	#
Púrpura trombocitopénica	Si	No	#
Psoriasis	Si	No	#

• Órgano-específico

	No. de veces		
Tiroiditis autoinmune	Si	No	#
Anemia perniciosa	Si	No	#
Enfermedad de Crohn	Si	No	#

Alergias No. de veces

Alergia no especificada	Si	No	#
Asma	Si	No	#
Conjuntivitis alérgica	Si	No	#
Rinitis alérgica	Si	No	#
Alimentos	Si	No	#

	No. de veces		
Conjuntivitis infecciosa	Si	No	#

Enfermedades febriles	Si	No	#
-----------------------	----	----	---

¿Ha consumido o ha estado consumiendo medicamento o vitaminas en los últimos 6 meses del embarazo?	Si	No	#
--	----	----	---

¿Cuáles?

Esquema de vacunación

De acuerdo al sistema nacional de vacunación especifique si ha recibido alguno de los siguientes refuerzos en los últimos 5 años:

	No. de veces		
Td (Tétanos, difteria)	Si	No	#
SR (Sarampión, rubeola)	Si	No	#
Antihepatitis (Hepatitis B)	Si	No	#
Tdpa (Tétanos, difteria, tos ferina)	Si	No	#
Antiinfluenza (Influenza)	Si	No	#
Antineumocócica polivalente (Infecciones por neumococo)	Si	No	#

TORCH:

(Toxoplasma Si No) (Rubeola Si No) (Citomegalovirus Si No) (Herpes Si No)

	No. de veces		
Candidiasis vaginales	Si	No	
Vaginosis bacteriana	Si	No	

Otras:

Otros padecimientos no especificados

Antecedentes familiares:

Mencione si alguno de sus familiares en primer grado (Madre, Padre, Hermanos o Hijos) presenta o ha presentado alguna enfermedad de la lista anterior.

Familiar	Enfermedad

En caso de embarazos previos, mencione si sus hijos presentaron infecciones de vías aéreas o gastrointestinales de repetición.

Hijo (Según orden de nacimiento)	Enfermedad
Primero	
Segundo	
Tercero	
Cuarto	
Quinto	
Sexto	

11.2 Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Cuantificación de IgA1 e IgA2 en calostro y su asociación con el número de enfermedades infecciosas durante el embarazo en diferentes compartimientos del SIM”

Investigador principal: _____

Sede donde se realizará el estudio: _____

Teléfono: _____

Investigador asociado: Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Sede donde se localiza: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV)

Teléfono y horario donde localizarlo: Tel. 57473800 Ext. 5020 en un horario de 11:00 a 18:00 horas de lunes a viernes.

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

La mayoría de los pacientes con deficiencia selectiva de anticuerpos tipo A no son diagnosticados y 50% de los casos presenta infecciones recurrentes de vías respiratorias altas (otitis, sinusitis), vías respiratorias bajas (bronquitis y neumonías), gastrointestinales y manifestaciones autoinmunes en el 30% de los casos.

El bebé no producirá anticuerpos tipo A detectable hasta el tercer mes de vida, razón por la que el calostro (sustancia que segrega el pecho los primeros días después del parto) es fuente indispensable de anticuerpos para el lactante. La mayor concentración de los anticuerpos detectadas durante las primeras 24 a 48 horas en calostro humano corresponde a los anticuerpos tipo A.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivos:

1. Detectar a las madres con enfermedades tipo infecciosas en población mexicana
2. Detectar y cuantificar los anticuerpos presentes en calostro, principalmente IgA1 e IgA2
3. Asociar el número y tipo de infección en usted con los niveles de anticuerpos tipo A.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

El beneficio que esperamos tener al llevar a cabo este proyecto es entender mejor los mecanismos de transferencia materna a través de anticuerpos en el calostro y como estos niveles presentan variaciones durante infecciones en el embarazo por un método no invasivo.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio le pediremos lo siguiente:

1. Una muestra de 1 a 1.5mLde calostro, misma que no tendrá ninguna consecuencia.
2. Que responda un breve cuestionario referente al número y tipo de infecciones sufridas en los últimos 6 meses.

ACLARACIONES

Ni usted ni su hijo(a) recibirán pago alguno por participar en este estudio, pero tampoco representará ningún costo para usted. Asimismo, le ofrecemos revisar y discutir con usted los resultados encontrados.

Usted no está obligado a participar en este estudio y puede retirarse en cualquier momento. Si Usted decide no participar, su relación con los doctores o el Hospital _____ no cambiará de ninguna manera y seguirán recibiendo los mismos tratamientos y cuidados médicos disponibles en el hospital.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicado o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento informado.

Firma del participante o del padre o tutor. Fecha

Testigo
Domicilio
Parentesco

Testigo
Domicilio
Parentesco.

En esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr. (a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento

Firma del investigador. Fecha.

11.3 Tabla 3. Listado de Barcodes

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

NAME OF PRIMER	ION TORRENT LINKER	GOLAY BARCODE	SPACER	16S rRNA Primer (5'-3')
V3-341 F51	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGAGAGCAAGTG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F52	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCATATGAGAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F53	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGGCTACACGAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F54	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGCTGCAGTCG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F55	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACAGCTAGCTTG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F56	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCTGTCTCTCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F57	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGTCTGTAGCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F58	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGAGCAAGAGCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F59	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCCATACTGAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F60	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGGTGTGATCGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F61	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AATCAGTCTCGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F62	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGACGTCTTAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F63	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGTGAGAGAAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F64	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTGACAGCCAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F65	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCGACTGTGCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F66	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTACGCTCGAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F67	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AATCGTGACTCG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F68	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGAGTGCTATC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F69	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTGATCCTAGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F70	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGAGTCCTGAGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F71	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCGAGCTATCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F72	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTACTGCAGGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F73	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACACACTATGGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F74	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGATGCGACCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F75	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGTTAGCACAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F76	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTGTACGCGTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F77	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGATACACGCGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F78	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCGCTGATGTG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F79	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACACATGTCTAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F80	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACATGATCGTTC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F81	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGCAACTGCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F82	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTGTGGAAGCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F83	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCGTAGGTCGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F84	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACACGAGCCACA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F85	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACATGTCACGTG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F86	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGCGATACTGG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F87	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTACGTGTGGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F88	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTGTGACTTCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F89	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGATCTTGCAAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F90	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCTATCCACGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F91	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTCCATAGCTG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F92	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACACGGTGTCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F93	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACATTACGCGCA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F94	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTTGTAGCAGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F95	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGATGTTCTGCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F96	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCTCCATACAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F97	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGCTATCTGGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F98	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTATTGTCACG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F99	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGAACACGTCTC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F100	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTGAGAGAAGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG

11.4 Publicaciones derivadas del proyecto de doctorado

Publicación derivada directamente del proyecto de doctorado

- **Sánchez-Salguero E**, Corona-Cervantes K, Guzmán-Aquino HA, de la Borbolla-Cruz MF, Contreras-Vargas V, Piña-Escobedo A, García-Mena J, Santos-Argumedo L. Maternal IgA2 Recognizes Similar Fractions of Colostrum and Fecal Neonatal Microbiota. *Front Immunol.* 2021 Nov 4;12:712130. doi: 10.3389/fimmu.2021.712130. PMID: 34804008; PMCID: PMC8601722.

Publicaciones derivadas indirectamente del proyecto de doctorado, publicadas en revistas internacionales

- Baltierra-Uribe SL, Montañez-Barragán A, Romero-Ramírez H, Klimov-Kravtchenko K, Martínez-Pedro KI, **Sánchez-Salguero E**, Camorlinga-Ponce M, Torres J, Santos-Argumedo L. Colostrum IgA1 antibodies recognize antigens from *Helicobacter pylori* and prevent cytoskeletal changes in human epithelial cells. *Eur J Immunol.* 2021 Aug 16. doi: 10.1002/eji.202049117. Epub ahead of print. PMID: 34398472.
- **Sanchez-Salguero ES**, Mondragón-Ramírez GK, Alcántara-Montiel JC, et al. Infectious episodes during pregnancy, at particular mucosal sites, increase specific IgA1 or IgA2 subtype levels in human colostrum. *Maternal Health, Neonatology and Perinatology* 2019 5: 9 <https://doi.org/10.1186/s40748019-0104-x>

Publicaciones derivadas indirectamente del proyecto de doctorado, publicadas en revistas nacionales

- **Sánchez-Salguero ES**, Rodríguez-Chacón BC, Leyva-Daniel J, Zambrano-Carrasco J, Miguel Rodríguez CE, Santos-Argumedo L. Antigenic stimulation during pregnancy modifies specific IgA1 and IgA2 subclasses in human colostrum according to the chemical composition of the antigen. *Rev Invest Clin.* 2020; 72 (2): 80-87. doi: 10.24875 / RIC.19003230. PMID: 32284627.
- **Sánchez Salguero ES**, Santos-Argumedo L. [Human microbiota association with immunoglobulin A and its participation in immune response]. *Rev Alerg Mex.* 2018 July-September; 65 (3): 184-198. doi: 10.29262 / ram.v65i3.519. Spanish. PMID: 30176205.



Maternal IgA2 Recognizes Similar Fractions of Colostrum and Fecal Neonatal Microbiota

Erick Sánchez-Salguero¹, Karina Corona-Cervantes², Hector Armando Guzmán-Aquino¹, María Fernanda de la Borbolla-Cruz¹, Víctor Contreras-Vargas³, Alberto Piña-Escobedo², Jaime García-Mena² and Leopoldo Santos-Argumedo^{1*}

¹ Department of Molecular Biomedicine, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico, ² Department of Genetics and Molecular Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), México City, Mexico, ³ Department of Gynecology Regional Hospital "October 1st", Institute for Security and Social Services of State Workers (ISSSTE), México City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Eric Cox,
Ghent University, Belgium

Reviewed by:

Koji Nomoto,
Tokyo University of Agriculture, Japan
Jicheng Zhan,
China Agricultural University, China

*Correspondence:

Leopoldo Santos-Argumedo
lesantos@cinvestav.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Mucosal Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 19 May 2021

Accepted: 19 October 2021

Published: 04 November 2021

Citation:

Sánchez-Salguero E,
Corona-Cervantes K,
Guzmán-Aquino HA,
de la Borbolla-Cruz MF,
Contreras-Vargas V,
Piña-Escobedo A, García-Mena J
and Santos-Argumedo L (2021)
Maternal IgA2 Recognizes Similar
Fractions of Colostrum and
Fecal Neonatal Microbiota.
Front. Immunol. 12:712130.
doi: 10.3389/fimmu.2021.712130

Microbiota acquired during labor and through the first days of life contributes to the newborn's immune maturation and development. Mother provides probiotics and prebiotics factors through colostrum and maternal milk to shape the first neonatal microbiota. Previous works have reported that immunoglobulin A (IgA) secreted in colostrum is coating a fraction of maternal microbiota. Thus, to better characterize this IgA-microbiota association, we used flow cytometry coupled with 16S rRNA gene sequencing (IgA-Seq) in human colostrum and neonatal feces. We identified IgA bound bacteria (IgA+) and characterized their diversity and composition shared in colostrum fractions and neonatal fecal bacteria. We found that IgA2 is mainly associated with *Bifidobacterium*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, and *Paracoccus*, among other genera shared in colostrum and neonatal fecal samples. We found that metabolic pathways related to epithelial adhesion and carbohydrate consumption are enriched within the IgA2+ fecal microbiota. The association of IgA2 with specific bacteria could be explained because these antibodies recognize common antigens expressed on the surface of these bacterial genera. Our data suggest a preferential targeting of commensal bacteria by IgA2, revealing a possible function of maternal IgA2 in the shaping of the fecal microbial composition in the neonate during the first days of life.



Keywords: IgA2, IgA1, microbiota, maternal transfer, IgA-seq, colostrum

INTRODUCTION

Neonatal acquisition of an adequate microbiota composition during early life (1) is regulated by various conditions like birth route (2), lactation mode (3), mother's diet, and maternal intestinal microbiota (4). Colostrum, the first secretion during lactation, contains factors contributing to the newborn's defense, immune stimulation, and it is an essential source of microorganisms for the first

Research Article

Colostrum IgA1 antibodies recognize antigens from *Helicobacter pylori* and prevent cytoskeletal changes in human epithelial cells

Shantal Lizbeth Baltierra-Urbe^{*1} , Alejandra Montañez-Barragán^{*1}, Héctor Romero-Ramírez¹, Ksenia Klimov-Kravtchenko^{1,2}, Karla Ivette Martínez-Pedro^{1,3}, Erick Sánchez-Salguero¹, Margarita Camorlinga-Ponce⁴, Javier Torres⁴ and Leopoldo Santos-Argumedo¹ 

¹ Department of Molecular Biomedicine, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico

² University Center of Biological and Agricultural Sciences (CUCBA) University of Guadalajara, Zapopan, Jalisco, Mexico

³ “La Cañada” University (UNCA), Oaxaca, Mexico

⁴ Infectious and Parasitic Disease Medical Research Unit (UIMEIP), Pediatric Hospital in National Medical Center (CMN-SIGLO XXI) Mexican Institute of Social Security (IMSS), Mexico City, Mexico

Helicobacter pylori is a Gram-negative bacterium found on the luminal surface of the gastric mucosa in at least 50% of the world's human population. The protective effect of breastfeeding against *H. pylori* infection has been extensively reported; however, the mechanisms behind this protection remain poorly understood. Human IgA from colostrum has reactivity against *H. pylori* antigens. Despite that IgA1 and IgA2 display structural and functional differences, their reactivity against *H. pylori* had not been previously determined. We attested titers and reactivity of human colostrum-IgA subclasses by ELISA, immunoblot, and flow cytometry. Colostrum samples from healthy mothers had higher titers of IgA; and IgA1 mostly recognized *H. pylori* antigens. Moreover, we found a correlation between IgA1 reactivity and their neutralizing effect determined by inhibition of cytoskeletal changes in AGS cells infected with *H. pylori*. In conclusion, colostrum-IgA reduces *H. pylori* infection of epithelial gastric cells, suggesting an important role in preventing the bacteria establishment during the first months of life. As a whole, these results suggest that IgA1 from human colostrum provides protection that may help in the development of the mucosal immune system of newborn children.

Keywords: colostrum, *Helicobacter pylori* · hummingbird phenotype · immunoglobulin A · protection type IV secretion system (T4SS) · cesarean delivery (C-section) · vaginal delivery (VD) · secretory IgA (SIgA)



Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Introduction

Helicobacter pylori is a Gram-negative bacterium found on the luminal surface of the gastric mucosa [1]. This bacterium is acquired early in life and induces a chronic infection unless it is treated [2]. At least 50% of the human population worldwide is infected [3]. In Mexico, approximately 50% of children are

H. pylori-positive at age 10, and more than 80% of adults are infected [4–6].

Attachment to gastric epithelial cells is a requisite for successful *H. pylori* colonization [7,8]. *Helicobacter pylori* virulence factors, such as toxins and functional components of a type IV secretion system (T4SS), have been associated with enhanced induction of gastritis, peptic ulcer, higher risk of gastric

Correspondence: Dr. Leopoldo Santos-Argumedo
e-mail: lesantos@cinvestav.mx


*Shantal Lizbeth Baltierra-Urbe and Alejandra Montañez-Barragán equally contributed to this manuscript.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Infectious episodes during pregnancy, at particular mucosal sites, increase specific IgA1 or IgA2 subtype levels in human colostrum



Erick Sánchez-Salguero¹, Geovanni Kaleb Mondragón-Ramírez^{1,2}, Julio C. Alcántara-Montiel³, Arturo Cérbulo-Vázquez^{4,5}, Xóchitl Villegas-Domínguez⁵, Víctor Manuel Contreras-Vargas⁶, María del Rocío Thompson-Bonilla⁶, Héctor Romero-Ramírez¹ and Leopoldo Santos-Argumedo^{1*} 

Abstract

Background: Colostrum is the primary source of maternal immunoglobulin A (IgA) for the newborn. IgA participates in protection and regulation mechanisms of the immune response at the neonate's mucosa. Several studies have evaluated infectious diseases and vaccine protocols effects during pregnancy on maternal milk IgA levels, with the aim to understand lactation protecting effect on newborn. However, most of their results demonstrated that there were no differences in the total IgA levels. In humans, IgA has two subclasses (IgA1 and IgA2), they have an anatomical distribution among mucosal compartments, their levels vary after antigen stimulation and are also seen to describe differential affinities in colostrum. Although there are differences between IgA subclasses in several compartments, these studies have excluded specific colostrum IgA1 and IgA2 determination.

Methods: We analyzed data from 900 women in Mexico City. With Pearson correlation, we compared the number of infectious episodes during their pregnancy that was associated with mucosal compartments (skin, respiratory and gastrointestinal tracts) and colostrum IgA subclasses.

Results: We show a correlation between increased colostrum IgA1 levels and the number of infectious episodes at respiratory tract and the skin. In contrast, infections at the gastrointestinal tract correlated with increased IgA2 amounts.

Conclusions: Infections present during pregnancy at certain mucosal site increase specific IgA subclasses levels in human colostrum. These results will help in understanding infections and immunizations effects on maternal IgA at the mammary gland, and their impact on the development and protection of the newborn.

Keywords: Immunoglobulin A, IgA1, IgA2, Respiratory tract, Gastrointestinal tract, Colostrum, Maternal transfer

Background

At birth, humans are exposed to the most important and diverse antigenic contact during our lives. Newborns interact with diverse array of microorganisms and environment molecules and learn to distinguish between commensal microbiota and potential pathogens. This interaction is seen to drive a susceptibility window for acute infections [1].

Through colostrum, newborns receive the highest amounts of defense, stimulation, and development molecules, during the first three days postpartum from their mothers. These factors include immunoglobulins, cytokines, chemokines, growth factors, etc. [2, 3]. Among these molecules, colostrum is considered as the primary source of immunoglobulin (Ig) A [4, 5]. Through lactation, IgA in the serum is seen to be associated with positive newborn health benefits, that includes protection against microorganisms [6], microbiota selection [7] and reduced risks of chronic, inflammatory and allergic diseases [8, 9].

* Correspondence: lesantos@cinvestav.mx

¹Department of Molecular Biomedicine, Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV), National Polytechnic Institute (IPN), Mexico City, Mexico
Full list of author information is available at the end of the article





ANTIGENIC STIMULATION DURING PREGNANCY MODIFIES SPECIFIC IGA1 AND IGA2 SUBCLASSES IN HUMAN COLOSTRUM ACCORDING TO THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE ANTIGEN

ERICK S. SÁNCHEZ-SALGUERO¹, BRENDA C. RODRÍGUEZ-CHACÓN^{1,2}, JORGE LEYVA-DANIEL^{1,3}, JOSUÉ ZAMBRANO-CARRASCO^{1,4}, CARLOS E. MIGUEL-RODRÍGUEZ^{1,5}, AND LEOPOLDO SANTOS-ARGUMEDO^{1*}

¹Department of Molecular Biomedicine, Center for Research and Advanced Studies, National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico; ²Laboratory of Molecular Microbiology and Environmental Biotechnology, Autonomous University of Guerrero (UAGRO), Chilpancingo, Gro., Mexico; ³Department of Biological Chemistry Sciences, University of Sonora (UNISON), Hermosillo, Son., Mexico; ⁴Faculty of Biological Sciences, Autonomous University of Puebla (BUAP), Puebla, Mexico; ⁵Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

ABSTRACT

Background: Several studies have evaluated the effect of infectious diseases and vaccine protocols during pregnancy on maternal milk immunoglobulin (Ig) levels, to understand the protection conferred by lactation on newborns. Colostrum is the primary source of maternal IgA for the newborn. IgA participates in protection mechanisms in the neonate's mucosa. In humans, IgA has two subclasses with differential anatomical distribution among mucosal compartments. Total IgA levels in maternal milk vary after antigen stimulation and have differential affinities in function of the chemical composition of the antigens. We studied the effect of antigenic stimulation during pregnancy on the concentrations of specific IgA1 and IgA2 subclasses in human colostrum. **Methods:** We analyzed data from 113 women in Mexico City and compared the amount of IgA subclasses in colostrum against three antigens: two from vaccine protocols (tetanus toxoid and pneumococcal polysaccharides) and lipopolysaccharide, a ubiquitous antigen in the gastrointestinal tract. **Results:** In agreement with the previous reports, we showed that IgA1 from colostrum mainly recognized protein antigens; in sharp contrast, IgA2 was mostly directed against polysaccharide antigens. These levels increased in women who had previous contacts through vaccination or infections during pregnancy. **Conclusions:** Antigen interaction during pregnancy increased the amount of specific IgA subclasses, depending on the chemical composition of the antigen. (REV INVEST CLIN. 2020;72(2):80-7)

Key words: Immunoglobulin A1. Immunoglobulin A2. Colostrum. Tetanus toxin. Lipopolysaccharides. Pneumococcal polysaccharides.

*Corresponding author:
Leopoldo Santos-Argumedo
E-mail: lesantos@cinvestav.mx

Received for publication: 30-08-2019
Approved for publication: 17-10-2019
DOI: 10.24875/RIC.19003230

0034-8376 / © 2019 Revista de Investigación Clínica. Published by Permanyer. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Human microbiota association with immunoglobulin A and its participation in immune response

La asociación de la microbiota humana con la inmunoglobulina A y su participación en la respuesta inmunológica

Erick Saúl Sánchez-Salguero,¹ Leopoldo Santos-Argumedo¹

Abstract

Human microbiota is the aggregate of microorganisms that reside in our body. Its phylogenetic composition is related to the risk for suffering from inflammatory diseases and allergic conditions. Humans interact with a large number and variety of these microorganisms via the skin and mucous membranes. An immune protection mechanism is the production of secretory IgA (SIgA), which recognizes resident pathogenic microorganisms and prevents their interaction with host epithelial cells by means of immune exclusion. Formerly, it was thought that SIgA only function in mucous membranes was to recognize and exclude pathogens, but thanks to the use of massive sequencing techniques for human microbiota phylogenetic characterization, now we know that it can be associated with pathogenic and non-pathogenic microorganisms, an association that is important for functions the microbiota carries out in epithelia, such as regulating the capability of certain microbial species to settle on the skin and mucous membranes, and stimulation and regulation of the immune response and of the risk for the development of inflammatory problems, allergic conditions, autoimmune diseases, and even cancer. Established microbiota determines the type of bacterial species (and probably viral and protozoan species) that reside on the skin and mucous membranes, promoting microbial diversity.

Keywords: Secretory Immunoglobulin A; Microbiota; Immunity; Allergy; Skin and mucosal membranes

Este artículo debe citarse como: Sánchez-Salguero ES, Santos-Argumedo L. La asociación de la microbiota humana con la inmunoglobulina A y su participación en la respuesta inmunológica. Rev Alerg Mex. 2018;65(3): 185-199

ORCID

Erick Saúl Sánchez-Salguero, 0000-0002-4417-2993; Leopoldo Santos-Argumedo, 0000-0002-4772-0713

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Departamento de Biomedicina Molecular, Ciudad de México, México

Correspondencia: Leopoldo Santos-Argumedo,
lesantos@investav.mx

Recibido: 2018-07-05
Aceptado: 2018-07-06
DOI: 10.29262/ram.v65i3.519



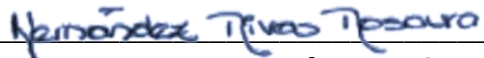
El jurado designado por el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional aprueba la tesis que presenta para su examen final de **Doctorado en Ciencias** en la especialidad de Biomedicina Molecular al **M. en C. Erick Saúl Sánchez Salguero**, el día 4 de noviembre del 2021.



Dr. Leopoldo Santos Argumedo
Tutor



Dr. Jaime García Mena
CoTutor



Dra. Rosaura Hernández Rivas
Asesora



Dr. Vianney Francisco Ortíz Navarrete
Asesor



Dra. Leticia Cedillo Barrón
Asesora



Dr. Francisco Javier Torres López
Asesor externo