



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Variación de la diversidad bacteriana leche materna
a lo largo del día”**

TESIS

Que presenta:

BIOL. NORMA GABRIELA ZAVALA TORRES

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS.

En la especialidad de:

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

Director de tesis:

Dr. JAIME GARCÍA MENA

Ciudad de México

Julio 2021

COMITÉ TUTORAL

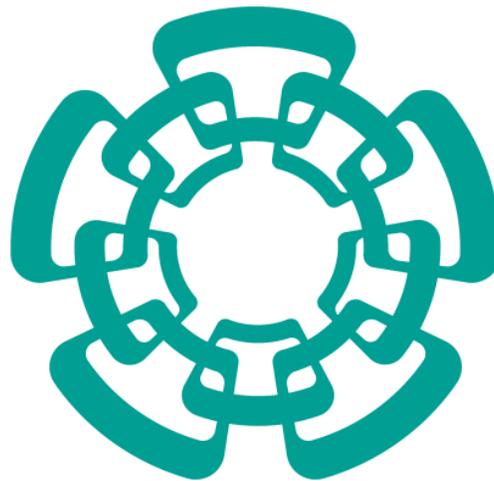
ASESOR INTERNO

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

ASESOR EXTERNO AL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Dr. Leopoldo Santos Argumedo
Departamento de Biomedicina
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Referencia y Apoyo para la Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular, bajo la dirección del Dr. Jaime García Mena en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco.



Cinvestav

Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia técnica con los reactivos, al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con el material del laboratorio y la Lic. Viridiana Rosas Ocegueda por su apoyo administrativo.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Este trabajo fue financiado por el Cinvestav y CONACyT 163235 INFR-2011-01.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Bulmaro Cisneros Vega por su asesoría y apoyo como parte del comité tutorial.

Dr Santos Argumedo por su apoyo como parte del comité tutorial.

Gaby Mora por facilitarme todos los tramites académicos durante la estancia en mi maestría.

Dr. Jaime García Mena por aceptarme en su equipo de trabajo y brindarme su tutoría y apoyo durante el desarrollo no sólo del proyecto, sino de la generación de varios artículos publicados durante mi maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el transcurso de la maestría (CVU: 997494).

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá por siempre apoyarme en mis sueños, sin ella no hubieran podido materializarse

A mi papá, gracias por creer que podría conseguir el grado incluso cuando las cosas no parecían favorables

A mis hermanos, Pablo gracias por escucharme cada vez que necesitaba un soporte emocional, siempre supe que podía contar contigo. Gus gracias por hablar conmigo ayudarme a no tomarme las cosas demasiado en serio

A Sayra, gracias por ser mi mejor amiga, esa persona con lo que no importa que tan cansada, desvelada o estresada estuviera podía sacarme una sonrisa

A Lola, que a pesar de que no te pude ver durante toda la pandemia siempre estuviste cerca ayudándome a crecer y festejando nuestros logros

A Andy, por creer incondicionalmente en mí, e imaginar que algún día la mantendré cuando viva de la ciencia, siempre me hizo reír eso

A Randy, por no ser solo mi pareja, sino mi mejor amigo, siempre supe que podía contar contigo y que emocionante saber que no solo entramos juntos a la maestría sino que también juntos la terminamos

A Armando, gracias por ser esa persona que siempre me emocione de ver en los pasillos, y de hablar nuestra experiencia en la maestría cada vez que nos veíamos

A Susana, gracias por darme el conocimiento y la motivación necesaria para entrar a un posgrado, eres una gran maestra

A la doctora Montse y al doctor Urrutia, gracias por permitirme tomar clases en Iztacala para recordar conceptos de la carrera y prepararme para el posgrado, gracias por compartirme exámenes y pasarme libros que me ayudaron a estudiar una vez que ingresé

A Kassandra, siempre fuiste alguien a quien admire, pero realmente aprecio mucho que me hayas ayudado todos los viernes por un año para que no reprobara mis materias, y pasar del miedo a reprobado a buscar un buen promedio, gracias por ayudarme a conseguirlo

A Kari, sabes que fuiste una parte indispensable de este proyecto, muchas gracias por ayudarme, por enseñarme y por tener la paciencia necesaria para completar mi formación, me siento muy honrada de poder trabajar contigo y espero algún día poder llegar a ser tan buena como tu

Erick, muchas gracias por ayudarme desde el primer momento que te contacte y en cada seminario departamental, espero algún día poder tener la energía sin comer ni dormir como tú lo haces

A mis compañeros de laboratorio 0, Juan, Tizziani, por compartir conmigo las buenas y malas experiencias del lab, a Loan y Fer, aunque fue muy breve mi interacción con ustedes son una gran inspiración para mi

A mis compañeros de la maestría con los cuales compartí muchísimas experiencias, con los que aprendí mucho pero también con los que me divertí

Índice

1. Introducción	7
1.1 Microbiota y su importancia	7
1.2 Vía entero-mamaria	7
1.3 Leche materna	9
1.4 Desarrollo de la microbiota en los primeros días de vida	10
1.5 Ciclo circadiano	11
2. Antecedentes	12
3. Justificación	15
4. Hipótesis	16
5. Objetivos	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos particulares	16
6. Alcance del trabajo	17
7. Metodología	17
7.1 Toma de la muestra	18
7.2 Extracción y purificación de DNA de leche materna	19
7.3 Extracción y purificación de DNA materia fecal	20
7.4 Amplificación de la región V3 de la subunidad ribosomal 16S de RNA	19
7.5 Obtención de genotecas y secuenciación por Ion Torrent	19
7.6 Análisis de datos de secuenciación	20
7.7 Análisis estadísticos de la microbiota	21
8. Resultados	23
8.1 Construcción de genotecas	23
8.2 Abundancias relativas	24
8.3 Taxones diferenciales entre grupos	25
8.4 Diversidad alfa	25
8.5 Diversidad beta	26
8.6 Heatmap	28
8.7 Predicción de metagenoma	29

10. Conclusiones	30
11. Cronograma de trabajo	32
12. Referencias	33
13. Suplementarias	35

Abstract

Many bacterial communities display oscillations throughout the day; it has been shown that in humans, the healthy gut microbiome also shows fluctuations in the abundance of bacterial community, related with feeding times and sleep cycles. Likewise, in human milk there are beneficial bacteria that undergo changes in the same time interval and are transferred to the newborn by breastfeeding, colonizing the gastrointestinal tract. The aim of this work was to identify changes in the bacterial diversity of human milk throughout the day. Human milk samples were collected from a single donor three times during the day (morning, afternoon, night) for 5 consecutive days, and bacterial DNA was extracted. Bacterial diversity was characterized by high-throughput DNA sequencing of 16S rDNA libraries, and taxonomy was assigned by comparison of sequences against a database. Finally, the significant differences in relative abundance and alpha and beta diversity were determined. The analysis of human milk displayed changes in the bacterial diversity during the day, with significant changes in the Shannon diversity index. Our data show that human milk seems to be affected by the daytime change, and these changes could influence the infant gut microbiota.

Resumen

Muchas comunidades bacterianas presentan variaciones diurnas a través del día, ha sido demostrado que, en personas sanas, la microbiota intestinal muestra fluctuaciones en la abundancia bacteriana relacionada a los tiempos de alimentación y ciclos de sueño. De la misma manera, en la leche materna hay bacterias beneficiosas que presentan cambios en el mismo intervalo de tiempo y son transferidos al recién nacido por amamantamiento, colonizando el tracto gastrointestinal. El objetivo de este trabajo es identificar cambios en la diversidad bacteriana de la leche materna a lo largo del día. La leche materna fue colectada de una sola donadora durante 3 horarios en el día (mañana, tarde, noche) por 5 días consecutivos y posteriormente fue extraído el DNA. La diversidad bacteriana fue caracterizada por secuenciación de librerías de 16S DNA y la taxonomía fue asignada por la comparación de secuencias en una base de datos. Finalmente, las diferencias significativas en abundancia relativa y la diversidad alfa y beta fueron determinadas. El análisis de la leche materna mostro cambios en la diversidad bacteriana durante el día con cambios significativos en el índice de diversidad de Shannon. Los datos muestran que la microbiota de la leche se ve afectada de acuerdo al horario del día y esos cambios podrían influenciar la microbiota intestinal del lactante.

Introducción

1.1 Microbiota y su importancia

Las bacterias han habitado la tierra por millones de años y aun actualmente forman la mayor cantidad de biomasa del globo terráqueo (Debelius *et al.*, 2016), a pesar de ser un planeta dominado de microbios, difícilmente viven individualmente en la naturaleza, más bien, coexisten y se adaptan a hábitats que colonizan, como es el caso de la relación entre las bacterias y los humanos, la cual se ha ido desarrollando coevolutivamente en donde el hospedero (humano) ha evolucionado en respuesta a sus contrapartes bacterianas (Moeller *et al.*, 2016).

Nuestros cuerpos adultos son hogar de trillones de microbios, la población celular microbiana excede el número de células humanas por un estimado orden de magnitud de 10 células bacterianas por cada célula humana, la mayoría se encuentran en el tracto gastrointestinal, en donde reside una población dinámica de microorganismos, los cuales mantienen la homeostasis intestinal y metabólica y nos protegen contra patógenos (Pflughoeft-Versalovic 2012; Peterson *et al.*, 2018; Thursby & Juge, 2017). A estos microorganismos comensales presentes en los humanos se les ha acuñado el termino de microbiota intestinal, la cual es desarrollada desde el nacimiento y coevoluciona con el hospedero en los primeros años de vida y es influenciada por diversos factores como la dieta, el estilo de vida y la nutrición (Wopereis *et al.*, 2014; Derrien *et al.*, 2019). Es importante el mantenimiento de la microbiota debido a los beneficios que ofrece al hospedero como el mantenimiento del epitelio intestinal, almacenamiento de energía, protección contra patógenos y la regulación de la inmunidad (Thursby & Juge, 2017). Wopereis *et al.*, 2014).

Gracias al avance tecnológico y bioinformático en 16S RNA que es el componente de la subunidad menor (30S) de los ribosomas procariontes, se ha determinado la diversidad de la microbiota intestinal, donde los phyla principales son *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*, variando en cada individuo. El balance de las bacterias presentes en el intestino es muy importante para la salud, ya que los cambios de la microbiota incrementa la susceptibilidad a enfermedades (Li *et al.*, 2018). Por esta razón, la microbiota ha sido sujeta a investigaciones extensas, aumentando la cantidad de hallazgos nuevos y preguntas abiertas alrededor del mundo en esta área. Una de las primeras iniciativas a larga escala dirigida a resolver un conjunto de estas preguntas fue: The Human Microbiome Project por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos en el año 2007 (NIH, por sus siglas en inglés) y The European Comissions Metagenomics of the Human Intestinal Tract (Blaser & Falkow, 2009; Peterson *et al.*, 2009), cuyo objetivo fue el desarrollo de secuencias de referencia, el desarrollo de herramientas estadísticas y computacionales, así como protocolos clínicos y analíticos (Integrative *et al.*, 2019).

1.2 Vía entero-mamaria

Inicialmente se consideraba que la leche era estéril o que la presencia de bacterias se debía a una mala toma de la muestra o por contaminación, sin embargo, ahora se conoce que la leche materna contiene bacterias comensales, mutualistas y potencialmente probióticas para el intestino del lactante y que son transmitidas a través del amamantamiento (Fig 2).

Al evaluar la diversidad microbiana en heces del binomio, así como leche materna, se ha planteado la vía entero mamaria donde las bacterias son transferidas del intestino de la madre, atravesando la barrera epitelial hasta llegar a las glándulas mamarias donde finalmente son transferidas al intestino del lactante por amamantamiento donde destacan los géneros *Clostridia*, *Coprococcus*, *Feacalibacterium*, *Roseburia* y *Subdoligranulum* (Jost *et al.*, 2014).

La colonización temprana juega un rol importante en determinar la microbiota del adulto, donde las posibles funciones son la maduración del sistema inmune, mejoramiento de la barrera intestinal o reducción de alergias, por mencionar algunos. Por otra parte, la presencia de bacterias con posible origen intestinal, en la sangre de donantes sanos, promovió el desarrollo de ideas sobre el transporte selectivo de componentes bacterianos en células mononucleares hacia las glándulas mamarias (Perez, 2007). Es por esto, que recientemente se han desarrollado investigaciones que relacionen la presencia de anticuerpos como inmunoglobulina A secretora (sIgA), identificando una alta similitud entre microbiota sIgA-relacionada en los ecosistemas del dímero madre-infante; intestino y heces (Dunne-Castagna, 2021; Qi, 2021), por lo que puede estar mediando esta transferencia vertical (Palmer *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2013).

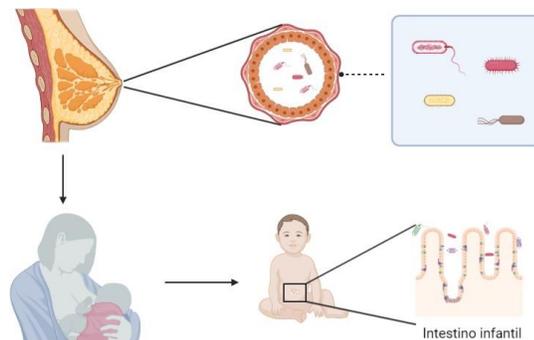


Fig 1. Forma de transmisión de bacterias por parte de la madre al recién nacido por amamantamiento. Imagen conceptualizada por NGZT.

1.3 Leche materna

El primer alimento que consume un neonato es un fluido biológico conocido como leche materna es un fluido biológico complejo, que procede de las glándulas mamarias de la madre y el cual está

adaptado para satisfacer los requerimientos nutricionales del recién nacido, siendo su mejor fuente alimenticia, adicionalmente confiere protección que ofrece a corto y largo plazo contra patógenos, educando el sistema inmune del recién nacido para inactivar patógenos.

En el momento del nacimiento, el recién nacido cuenta con un sistema inmune poco desarrollado que lo mantiene con un alto riesgo a infecciones; afortunadamente el calostro y la leche materna protegen al lactante en este periodo de vulnerabilidad (Donovan & Comstock 2016).

La leche materna cuenta con células inmunocompetentes, inmunoglobulinas, ácidos grasos, oligosacáridos, lactoferrina y otras glicoproteínas, las cuales inactivan patógenos. Por otro lado, se ha reportado que existe una amplia diversidad de bacterias comensales en la leche materna de mujeres sanas lactantes, estas bacterias están relacionadas en la colonización temprana de del intestino de los recién nacidos, ya que el lactante consume un aproximado de 800 ml al día de leche materna, en promedio ingiere 1×10^5 bacterias diariamente. Estas bacterias juegan de igual manera un rol importante en el intestino neonatal, contribuyendo a la reducción de la incidencia y severidad de infecciones (Corona-Cervantes *et al.* 2020; Fernández *et al.*, 2013). Es por este motivo que se recomienda que los neonatos tomen exclusivamente leche materna por 6 meses o más (Donovan & Comstock 2016).

La microbiota intestinal es crucial para el desarrollo del sistema inmune y la regulación de las respuestas inmune, especialmente durante la infancia, sin embargo, el desarrollo de la microbiota intestinal es vulnerable a disbiosis por factores externos (Volery *et al.*, 2020). Afortunadamente, el calostro y leche materna son una fuente continua de bacterias comensales y potencialmente probióticas que son transferidas al intestino del neonato, solo dentro de los primeros 6 días posteriores al parto, la leche materna contribuye con el 67.7% de las bacterias presentes en el intestino neonatal. Estas bacterias persistirán durante toda la vida al prolongar la alimentación exclusiva por leche materna (Togo & Amadou, 2019; Fernández *et al.*, 2013; Corona-Cervantes *et al.*, 2020). Las especies bacterianas más comunes en la leche son *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* asociadas a una ausencia de infección sin embargo hay un aproximado de 300 especies bacterianas presentes en la leche (Togo & Amadou, 2019).

Desafortunadamente, en México la lactancia en menores de 6 meses o de cualquier tipo desciende rápidamente con la edad del niño, se encuentran en mayor medida en grupos vulnerables (mujeres en el medio rural, bajo nivel socioeconómico, educación menor a la primaria, entre otros).

Se observa un deterioro marcado en los resultados de las prácticas de lactancia materna y alimentación complementaria (PLMAC) en las Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición (ENSANUT) del año 2006 al 2012 se evidenció un descenso importante en la lactancia materna ya que el 48% de los niños menores de 6 meses y 33% de los niños entre 6 y 24 meses ingirieron

alimentos de origen animal, a pesar de que los resultados de ENSANUT 2018-19 indican mejoría en el inicio temprano de alimentación en leche materna, aumento el porcentaje de niños <12 meses que fueron alimentados con algún líquido diferente a la leche materna en los primeros tres días de vida lo que pone al recién nacido en riesgo de mala nutrición y de muerte en un plazo corto, se reporta que 13.6 % de los niños menores de 5 años padecen desnutrición crónica y el 14% de los preescolares tienen talla baja y retraso en el crecimiento.

Actualmente la situación no aparenta mejoría ya que solo el 28.6% de la población da lactancia exclusiva, lo que significa, lo que significa que 3 de cada 10 madres mexicanas amamantan a sus hijos desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad provocando un aumento de la desnutrición, alergias y trastornos gastrointestinales e inmunológicos en los niños.

1.4 Desarrollo de la microbiota en los primeros años de vida

En el desarrollo de una persona existen diversos cambios, como es el de la microbiota, la cual involucra una serie de reemplazos de especies bacterianas que se encuentran de manera normal en la niñez, pero rara vez son encontradas en el colon de un adulto sano.

La transformación de la microbiota intestinal a una de adulto involucra el reemplazo de especies bacterianas encontradas en los infantes (Palmer *et al.*, 2007). La microbiota intestinal en el infante se desarrolla en los primeros años de vida debido a que en este periodo, los infantes pasan por la etapa de mayor desarrollo expresado en un crecimiento rápido y generalizado donde la microbiota intestinal juega un papel clave influenciando la maduración del sistema inmune, absorción de nutrientes, metabolismo y previniendo la colonización de patógenos, por esta razón la intervención a temprana edad permite modular la microbiota para promover la salud a largo plazo (Derrien *et al.*, 2019).

Al estudiar el cambio de la microbiota desde recién nacidos hasta el primer año de vida, se pudo determinar que al pasar de los meses la diversidad alfa aumenta mientras que la diversidad beta disminuye, lo que indica una comunidad más compleja y heterogénea, por otro lado, al pasar por el periodo de ablactación es cuando existe el mayor cambio en la microbiota (Bäckhed *et al.* 2015).

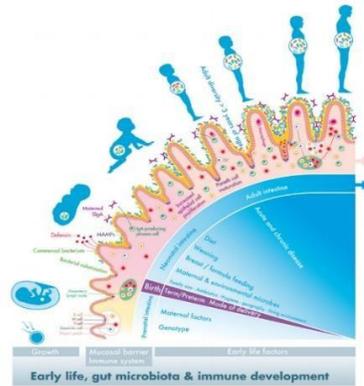


Figura 2. Se muestra el patrón de establecimiento de la simbiosis en el bioma microbiano humano del tracto digestivo-hospedero humano a lo largo de la vida, desde antes del alumbramiento: con la presencia de ADN bacteriano en líquido amniótico, al nacer: con la inoculación de microbios maternos y ambientales, y en la adultez donde factores como la alimentación, sexo, uso de medicamentos entre otros factores cumplen un rol fundamental en la diversidad de la microbiota. Tomada de (Wopereis *et al.*, 2014).

1.5 Ciclo circadiano

Los ritmos circadianos están presentes en casi todos los organismos en respuesta al cambio continuo de luz por la rotación del planeta sobre su propio eje (Liang *et al.*, 2015). Estos ciclos son regulados por relojes biológicos autónomos celulares que oscilan en un ciclo de 24 horas y los cuales son fundamentales en la regulación fisiológica de los seres vivos, ya que permite a los organismos adaptarse y anticiparse a cambios temporales en el ambiente (Rijo-Ferreira & Takahashi, 2019). Este ciclo se ve afectado en los humanos debido al estilo de vida actual como por ejemplo la exposición anormal de luz en horarios nocturnos, viajes en avión de más de 14 horas de vuelo (conocido como jet lag), desregulación de los horarios de sueño, y horarios alimenticios irregulares están asociados con incremento en el riesgo de padecer cáncer, desordenes metabólicos como una baja tolerancia a la glucosa y enfermedades cardiovasculares y cerebrales. Incluso en enfermedades exhiben ritmicidad en su patología como la artritis reumatoide o asma (Scheiermann & Loudon, 2018; Thaïss *et al.*, 2014) (Fig 3.).

De las primeras observaciones de organismos involucrados en este proceso rítmico, describen la presencia de bacterias fotosintéticas como las cianobacterias, sin embargo el reloj circadiano funciona de igual manera en bacterias no fotosintéticas, como aquellas presentes en la microbiota intestinal que ayudan a mantener la homeostasis intestinal (Costantini *et al.*, 2020). Intrínsecamente la composición y diversidad de la microbiota intestinal es sensible a la dinámica circadiana, la cual está fuertemente relacionada con la ingesta de alimentos y la disponibilidad de nutrientes. (Voigt *et al.*, 2014).

Los ritmos microbianos regulan una variedad de procesos en el tracto gastrointestinal incluyendo proliferación celular, homeostasis inmune, permeabilidad en el intestino, balance

bacteriano y metabolismo además de modular la disponibilidad de comida, la cual favorece la susceptibilidad a enfermedades metabólicas (Pearson & Wong, 2020).

Muchas de estas bacterias exhiben oscilaciones en su diversidad a lo largo del día regulado por los horarios en la alimentación y ciclos del sueño del hospedero, contribuyendo en la homeostasis y participando en diversos procesos fisiológicos, manteniendo todo el cuerpo sano (Thaiss *et al.*, 2014; Trinder *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la microbiota intestinal tiene la habilidad de regular o modificar los ritmos circadianos centrales y del hígado así como ciertas funciones metabólicas, lo que significa que al existir una alteración en el ciclo, la utilización de probióticos y prebióticos podrían mejorar la desalineación del ciclo (Song *et al.* 2020).

La infancia representa una etapa importante de programación circadiana en donde la leche materna podría ayudar a facilitar el desarrollo de ciclo circadianos estables (Hahn-Holbrook *et al.* 2019) debido a que bacterias presentes en la leche materna son transferidas al recién nacido por amamantamiento (Corona-Cervantes *et al.* 2020) estas podrían ser reguladas de forma similar. Adicionalmente, otros estudios sugieren que algunos componentes de la leche materna como son: proteínas, nucleótidos, vitaminas, entre otros están sometidos a variaciones diurnas en sus concentraciones de la misma manera que lo hace la microbiota tanto en ratones como en humanos (Thaiss *et al.*, 2014; Italianer *et al.* 2020).

Antecedentes

Desde hace décadas se ha estudiado acerca de la respuesta a infecciones letales y endotoxinas relacionadas a los ciclos circadianos, el primer estudio fue realizado por Halberg y colaboradores en 1960, en el cual analizaron la supervivencia de ratones al ser tratados con dosis mortales de *E. coli* a diferentes horas, en un periodo de 24 horas, esto con el objetivo de determinar si un ciclo relacionado a la luz era capaz de cambiar la respuesta de toxicidad, y lo que encontraron fueron diferencias en la mortalidad de los ratones relacionado a la hora en la que se les fue inyectada la toxina, concluyendo que no hay una susceptibilidad evidente a los ritmos circadianos.

Summa y colaboradores en 2013 encontraron que el ciclo circadiano estaba asociado al mantenimiento de la barrera intestinal, al alterar el ciclo circadiano de ratones se afectaba la integridad de la barrera epitelial del intestino, aumentando la permeabilidad la cual hacía al ratón susceptible a diversos padecimientos.

En el 2014, la investigadora Anne Curtis y colaboradores determinaron que la hora del día es crítica para la respuesta inmune de algunas proteínas como donde BMAL, CLOCK y REV-ERB α cumplen un rol importante en la respuesta inmune.

De igual manera en 2014 Thaiss *et al* busco demostrar que la microbiota del intestino tiene oscilaciones diurnas las cuales se le regulan por los ritmos de alimentación del hospedero y que las modificación del ciclo circadiano resulta en un aumento de peso, disbiosis y como consecuencia conlleva a un desequilibrio metabólico. Notablemente también demostraron que el “jet-lag” induce fluctuaciones de la microbiota aberrantes donde tanto en ratas como en humanos promueve la intolerancia a la glucosa y la obesidad. Finalmente al hacer trasplante fecal a un ratón libre de germen de un ratón con su ciclo circadiano alterado, se transmitieron las aberraciones de la microbiota característico del ratón sometido al estímulo.

Abordando uno de los genes encargados del ciclo circadiano (*Bmal1*), en un estudio en ratones, en el año 2015, se elimino *Bmal*, con esto, se induce una alteración en la abundancia de la microbiotas.

En el año 2016 Joanna Long y su equipo de trabajo observaron la respuesta inmune en el tiempo de vacunación y determinaron que el sistema inmune esta bajo el control del ciclo circadiano, se vacunaron a 276 adultos mayores contra la influenza en dos tiempos diferentes (mañana y tarde) observando que un mes después de la vacunación, las personas que habían sido vacunadas en un horario matutino presentaban una mayor cantidad de anticuerpos que las personas vacunadas en horario vespertino.

En la Universidad de Tokio en el año 2017, Takayasu y su equipo de trabajo investigaron como factores ambientales como es el cambio de luz/obscuridad en el día provocaban un cambio en la diversidad de la microbiota salival de 6 voluntarios sanos (Figura 2).

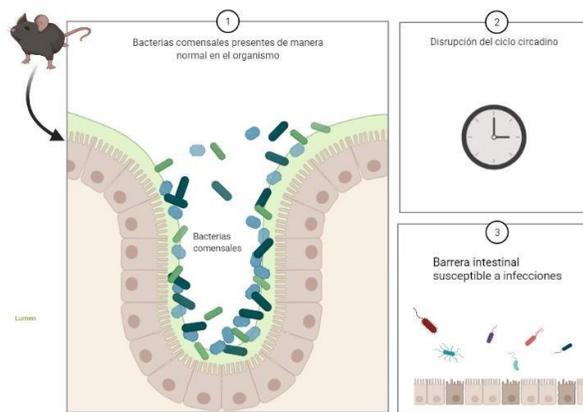


Fig 3. Esquema del microbioma intestinal rítmico. En condiciones de salud la microbiota es rítmica en su composición y abundancia generando homeostasis intestinal. En el caso de disrupción, perturba la ritmicidad de la microbiota con consecuencias en la homeostasis del hospedero Imagen conceptualizada por NGZT

Finalmente en el año 2020 Thomas Butler y Julie Gibbs identificaron influencia de ciclo circadiano, la interacción del microbioma y como a su vez este afecta la inmunidad, encontrando que el 25% del microbioma total presentaban variaciones a lo largo del día.

Justificación

La lactancia es un evento de alta importancia, no solo por la estrecha relación que forma la madre con el recién nacido sino también por la gran variedad de estudios que han establecido que la leche materna son una fuente continua de bacterias benéficas para el neonato, esta transmisión de bacterias por parte de la madre es un factor clave en la construcción de la microbiota intestinal en el lactante, donde diversos factores pueden modificar la microbiota intestinal como es el ciclo circadiano, sin embargo, no está reportado si la microbiota de la leche materna sufre modificaciones de acuerdo a la hora del día de la misma manera que la microbiota intestinal (Fernández *et al.*, 2013; Belmonte *et al.*, 2010; Funkhouser *et al.* 2013).

La composición bacteriana de la leche materna es compleja y muy diversa, lo que forma un ambiente adecuado para el desarrollo de la delicada comunidad microbiana que será establecida durante los primeros seis meses de vida, y que es considerada importante para la salud del infante ya que es la mejor forma de prevenir enfermedades y mortalidad infantil (Obermajer *et al.*, 2015; Hunt *et al.*, 2011; Corona-Cervantes *et al.*, 2020), Desafortunadamente, en México solo el 28.6% de la población da lactancia exclusiva, lo que significa que 3 de cada 10 madres mexicanas amamantan a sus hijos desde el nacimiento a los 6 meses de vida de acuerdo a las Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición del año 2019.

Una forma de difundir la cultura de la lactancia materna y aumentarla entre la población es la realización de estrategias sociales eficientes que se apliquen a nivel poblacional, donde se expliquen temas como la diversidad microbiana en la leche materna y causas de disbiosis como una disrupción en el ciclo circadiano, los cuales fomentarán la cultura de prevención y contribuirán al conocimiento sobre el papel funcional vital de la leche materna para aportar factores y promover la buena salud del neonato/infante amamantado en México.

Por esta razón el objetivo de este trabajo es determinar la variación de la diversidad bacteriana de la leche materna, de acuerdo con la hora del día y si existe alguna relación entre los grupos bacterianos provenientes de la leche y los que se establecen en el intestino del recién nacido.

Hipótesis

Las bacterias presentes en leche materna serán diferentes de acuerdo con la hora del día, aumentando o disminuyendo su diversidad, por otro lado, las bacterias que se establecen en el colon del neonato serán similares a las de la leche materna.

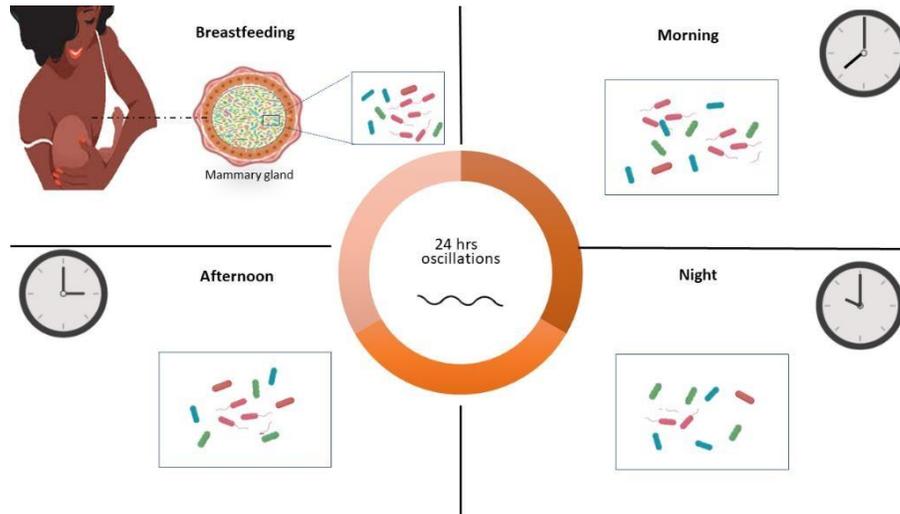


Fig. 4. Representación del cambio en la diversidad bacteriana a lo largo del día (Imagen conceptualizada por Zavala-Torres N. G.).

Objetivo General

- Determinar cambios en la diversidad bacteriana en diferentes horarios del día.

Objetivos Particulares

- **Objetivo particular 1.** Identificar y comparar las especies bacterianas en le leche materna y heces del binomio madre-hijo de madres mexicanas sanas en 3 diferentes horas del día
Actividad 1.1 Recolectar muestras de leche materna de madres mexicanas sanas, así como muestras de materia fecal de la madre y del neonato.
Actividad 1.2 Determinar el perfil de bacterias en la leche materna y heces con base al horario del día
- **Objetivo particular 2.** Caracterizar con V3 16S-rDNA, la diversidad microbiana de la leche materna, así como la de la materia fecal del neonato y la madre.

Actividad 2.1 Extracción de DNA por medio de un kit comercial para la amplificación de la región V3 del gen 16S ribosomal mediante PCR.

Actividad 2.2 Construcción de genotecas de secuenciación semiconductor de iones usando el equipo PGM de Ion Torrent.

- **Objetivo particular 3.** Establecer una relación entre la diversidad de la microbiota de las heces y la leche materna con la diversidad de la microbiota del intestino del lactante en relación con variables sociodemográficas, antropométricas y clínicas de las donantes.

Actividad 3.1 Obtener un modelo predictivo de asociación entre la diversidad de la microbiota de las heces y leche materna y la diversidad de la microbiota del intestino del lactante en relación con los factores ambientales y clínicos.

- **Objetivo particular 4.** Contribuir a la promoción de la práctica de amamantamiento e la población mexicana.

Actividad 4. Diseñar un video educativo corto sobre la importancia de la microbiota en la salud materno-infantil

Alcance del trabajo

Se busca encontrar un perfil particular de comunidades bacterianas relacionadas a la hora del día en binomio madre-hijo. En un total de 7 meses se obtuvieron muestras de leche y materia fecal de 1 madre con sus hijo, se secuenciaron genotecas para un posterior análisis bioinformático donde se determinaron comunidades bacterianas. Este trabajo es un preámbulo para entender la comunicación entre ciertos grupos bacterianos y su asociación con el ciclo circadiano, lo que provee oportunidades para posteriormente poder modificar hábitos de la madre como los horarios de sueño y alimentación que se verá reflejado en la salud del neonato.

Metodología

Toma de la muestra

Las muestras de leche materna fueron colectadas a tres horas diferentes en el día(mañana/tarde/noche), así como una muestra diaria de heces de 1 madre mexicanas de un rango de edad entre 18 y 45 años, con embarazo a término (de 38 a 42 semanas de gestación), que dieron a luz por cesárea, y se tomaron muestras de heces (una diaria) de sus hijo sano con la correspondiente aprobación de los Comités de Investigación y Bioética.

Los criterios de exclusión serán madres con diabetes gestacional, eclampsia o preeclampsia, tratamiento hormonal, malnutrición, enfermedades crónicas autoinmunes, y adicción de drogas. (Ramírez-Santana *et al.*, 2012; Sánchez-Salguero *et al.*, 2019). Para obtener el consentimiento informado de cada madre, fue realizado un tríptico para informar a las participantes acerca de que es la microbiota y su importancia, la función de la leche en el intestino del recién nacido, el objetivo del estudio y el beneficio que obtiene al participar en el mismo. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada madre después de recibir información del objetivo y diseño del estudio de acuerdo con la Declaración de Helsinki, revisión de año 2013.



Fig. 5. Tríptico informativo para las participantes del estudio de la variación de la diversidad bacteriana en la leche materna a lo largo del día.

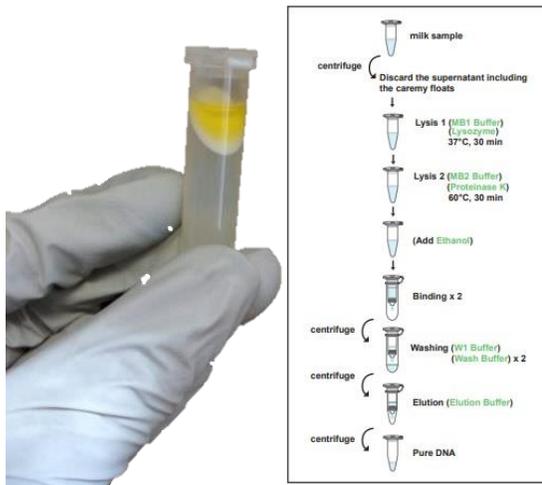
Para la recolección de la muestra de leche materna se realizó un instructivo para facilitar a las participantes la toma de la muestra donde con instrucciones sencillas y un código de colores, se les explica de manera concisa que tubo debe de utilizar para cada muestra. Para la toma de leche materna, fueron limpiados los pezones con jabón y agua estéril, posteriormente fueron cuidadosamente secados con toallas de papel estériles, especialmente en el área de las areola y pezones. La muestra de leche materna fue tomada a tres horas diferentes en el día y fueron expresadas con masajes suaves circulares (Jiménez *et al.*, 2008; Obermajer *et al.*, 2015). Posteriormente, se colectaron de 2.0 a 5.0 mL de leche materna en tubos de plástico tipo Falcon estériles y fueron almacenados a -20°C para su posterior procesamiento en el laboratorio (Sánchez-Salguero *et al.*, 2019; Ramírez-Santana *et al.*, 2012). En el caso de las muestras de copro del binomio madre-hijo fueron colectados en recipientes de plástico y almacenados a 4°C para su procesamiento. Finalmente, fueron registrados los datos sociodemográficos, antropométricos y clínicos de cada binomio.



Fig. 6. Tríptico tipo instructivo para la toma de muestra para cada participante

Extracción y purificación de DNA de leche materna

Para la extracción de DNA de leche materna, la muestra tuvo que ser pre-procesada para eliminar el contenido de grasa, por lo que un mililitro de leche fue centrifugado a 5000 g durante 10 min a 4° C en una centrifuga refrigerada (Eppendorf 5415R) y la grasa localizada en la parte superior del tubo fue removida con un rollo de algodón estéril.



El sobrenadante será removido por decantación, la pastilla será resuspendida en 1.0 mL de PBS estéril a pH de 7.4, para su posterior centrifugación a 10,000 g por 15 min. Posteriormente la pastilla obtenida fue procesada para extracción de DNA usando el kit FavorPrepMilk (Cat.: FAMBD001, Favorgen, Biotech Corp, Taiwan) siguiendo las instrucciones del fabricante

extracción de DNA genómico

Extracción y purificación de DNA de materia fecal

El DNA fecal fue extraído de 200 mg de las muestras fecales usando el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Cat.: 12830-50, Qiagen, Holanda), de igual manera siguiendo las instrucciones del fabricante. En ambos casos 300µL de PBS a pH de 7.4 fueron utilizados como controles negativos

para la extracción de DNA. La concentración de DNA en las muestras fue determinada con la absorbancia 260/280 con el espectrofotómetro (Thermo Scientific, USA). Para determinar la integridad del DNA se evaluará con fraccionamiento electroforético en 0.5 % de gel agarosa. Posteriormente será almacenado a -20° C hasta su posterior secuenciación (Corona-Cervantes *et al.*2020).

Amplificación de la región V3 de la subunidad ribosomal 16S de RNA

Posterior a la extracción, el DNA fue utilizado para preparar genotecas con primers o cebadores específicos dirigidos para región polimórfica de V3 del gen rDNA 16S. Se utilizaron los cebadores V3-341F y V3-518R, conteniendo el adaptador para la secuenciación masiva:

V3 341F: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

V3 518R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

De cada muestra de ADN se amplificará un fragmento de 281 pb correspondiente a la región hipervariable V3 del DNA ribosomal 16S bacteriano.

La amplificación se realizó mediante PCR de punto final de un volumen final de 25 µl con las siguientes condiciones:

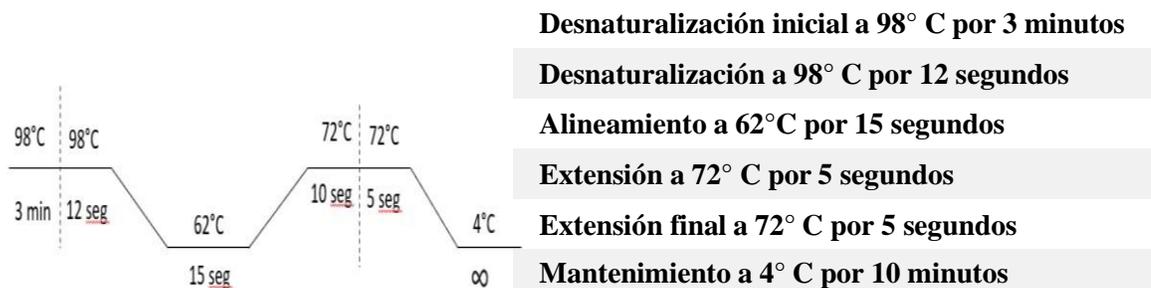


Tabla 1. Condiciones de 28 ciclos para amplificar de la región V3 de la subunidad ribosomal 16S de RNA.

Obtención de genotecas y secuenciación por Ion Torrent

Después de preparar las genotecas de amplicones para las muestras de heces y leche materna se llevaron a cabo los análisis de calidad, así como el acondicionamiento de las muestras para secuenciación semiconductora de iones usando el equipo Ion Torrent de acuerdo con la siguiente descripción:

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

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

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

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

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

Análisis de los datos de secuenciación

Las lecturas obtenidas por el equipo se procesaron utilizando el “software Torrent Suite v4.4.3” Se asignaron las lecturas a la muestra de origen por medio de los “barcodes”. Las lecturas que aprobaran las pruebas de calidad fueron exportadas como archivos FASTQ que posteriormente fueron transformados a archivos FASTA.

Para el análisis de comunidades bacterianas, se procesaron utilizando el programa bioinformático de QIIME 2 Core 2020.2 (<http://qiime.org/>), una herramienta bioinformática útil para la determinación taxonómica.

Las secuencias de calidad fueron clasificados en amplicones de secuencia variable (ASVs) con la base de datos de referencia Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/>). La abundancia relativa de los grupos bacterianos en leche y copro se reportará a diferentes niveles taxonómicos, así como la diversidad alfa (dentro de las muestras) y beta (entre las muestras). Para detectar taxones diferencialmente abundantes entre los grupos se utilizará LEfSe (efecto del análisis de discriminación lineal) (Segata *et al.*, 2011). Finalmente, el análisis PICRUST (Investigación filogenética de comunidades por reconstrucción de los estados no observados) permitirá predecir el potencial funcional de la microbiota asociada a la leche y su comparación con la del intestino neonatal (Langille *et al.*, 2013).

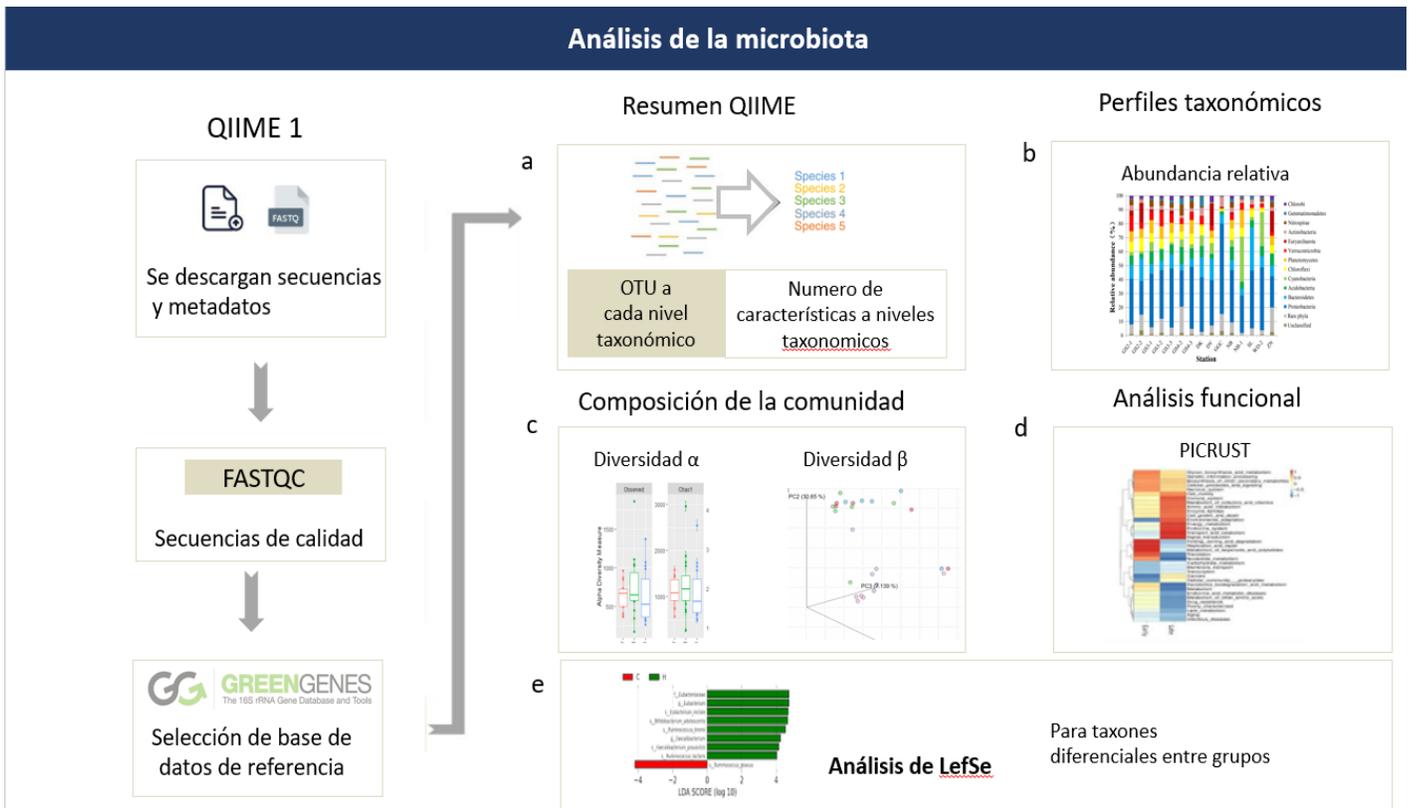


Fig. 8. Diagrama de la experimentación y análisis desde la extracción de DNA, obtención del amplicón hasta la utilización del programa phyloseq. Tomado de McMurdie *et al.* 2013.

Análisis estadístico de la microbiota

Se utilizará el software SPSS v23.0 para los análisis estadísticos donde el análisis de datos se hará por t-Student o Manh Withney. Los valores de $p < 0.05$ se consideran significativos.

La diversidad de la microbiota fue calculado por diversidad alfa y beta, para el caso de la de diversidad alfa, se analizó por especies observados, índice de Chao, índice de Shannon e índice de Simpson.

Por otro lado, la diversidad beta se analizó por UniFrac generando diagramas de coordinados principales y la abundancia relativa de los grupos bacterianas identificados en las muestras se compararon por la prueba de rangos de Wilcoxon por el software SPSS v.23.0

El algoritmo LDA Side Effect (Lefse) fue utilizado para identificar taxones estadísticamente significativos en los diferentes grupos de muestra (Segata *et al* 2011).

Se usó PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) para predecir metagenomas funcionales basados en el gen rRNA 16S utilizando base de

datos de genomas de referencia.

La asociación entre la abundancia de las comunidades microbianas y las diferentes variables ambientales y clínicas, se determinará mediante análisis multivariado y será validado con MaAsLin (Morgan *et al.*, 2012). Se considerará un valor significativo de $P < 0.05$, y valor de (*FDR-false discovery rate*) $q < 0.025$ (Benjamini & Hochberg, 1995).

Resultados

Construcción de Genotecas para la secuenciación por Ion Torrent

A partir de las muestras de leche y copro se corrió un gel de agarosa al 2% donde se amplificó un fragmento de 281 pb correspondiente a la región hipervariable V3 de gen ribosomal 16S bacteriano.

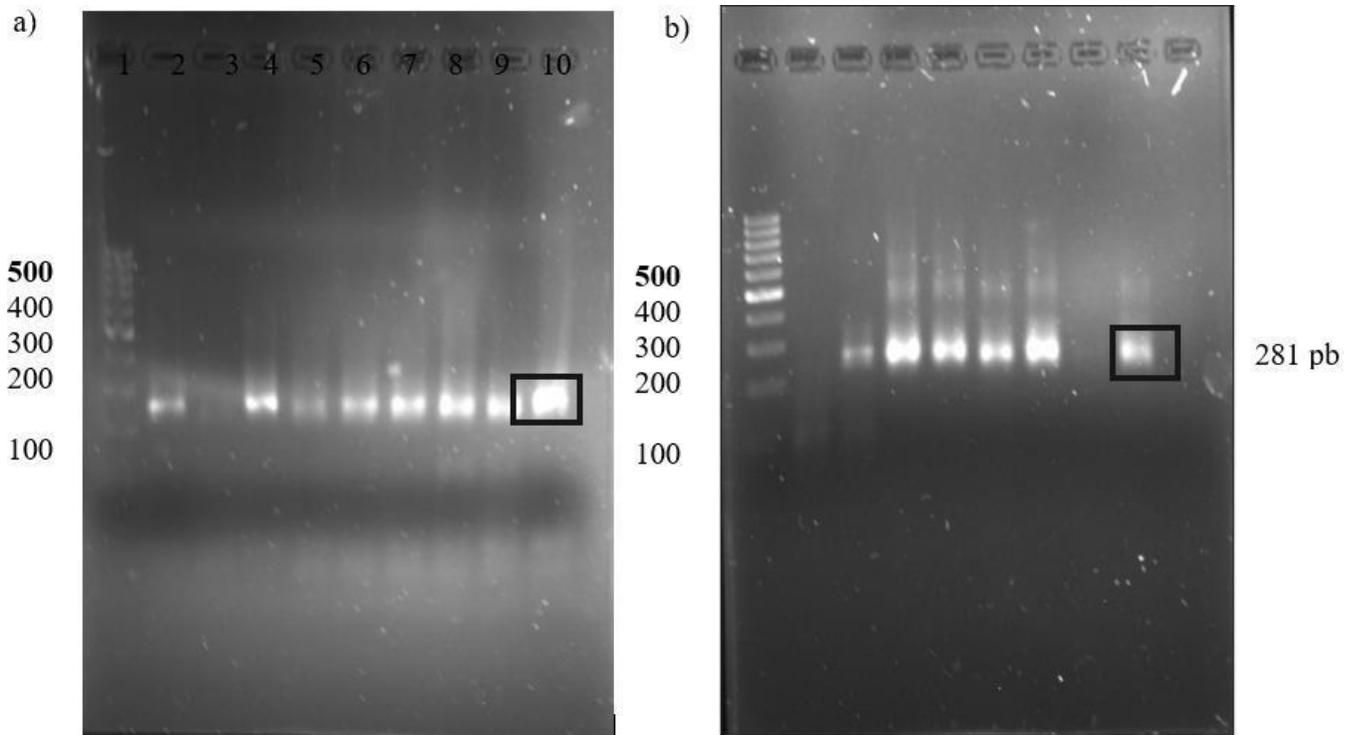


Fig. 9. Gel de agarosa al 2% de la región hipervariable V3 a) DNA genómico de heces b) DNA genómico de leche materna.

Abundancias relativas

Se determinaron las abundancias relativas de la microbiota a nivel de familia y género en cinco grupos de muestras: leche en la mañana, en la tarde y en la noche, así como heces de la madre y heces del lactante. En las muestras de leche tomadas en tres diferentes horarios se encuentran similitudes a nivel taxonómico de género donde en el caso de la leche hay una predominancia del género *Pseudomonas*, seguido de *Lachnospiraceae* y *Lactococcus*. Por otro lado, en el caso de heces de madre-hijo se encuentran mismos géneros bacterianos como *Lachnospiraceae* y *Blautia* pero en diferentes proporciones (Figura 10).

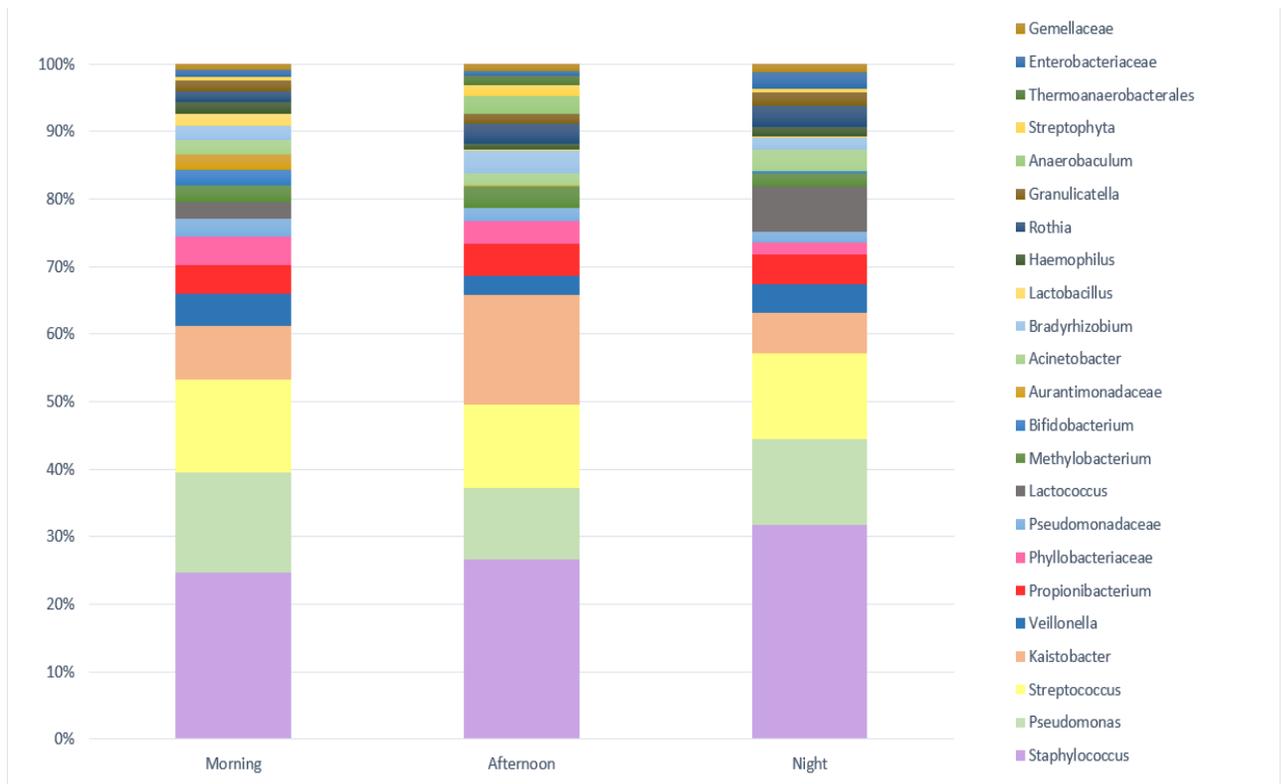


Fig. 10. Comparación de abundancias relativas de la leche en diferentes horarios del día, así como las heces del binomio madre-hijo.

Taxones diferenciales entre grupos

Se utilizó el algoritmo LEfSe para identificar las diferencias taxonómicas significativas en la microbiota de los grupos de muestras estudiados. El programa LEfSe idéntica las diferencias entre dos grupos biológicos por medio del análisis estadístico de Kruskal-Wallis, la prueba de rangos de Wilcoxon y un análisis de discriminación linear (LDA) para estimar el tamaño del efecto

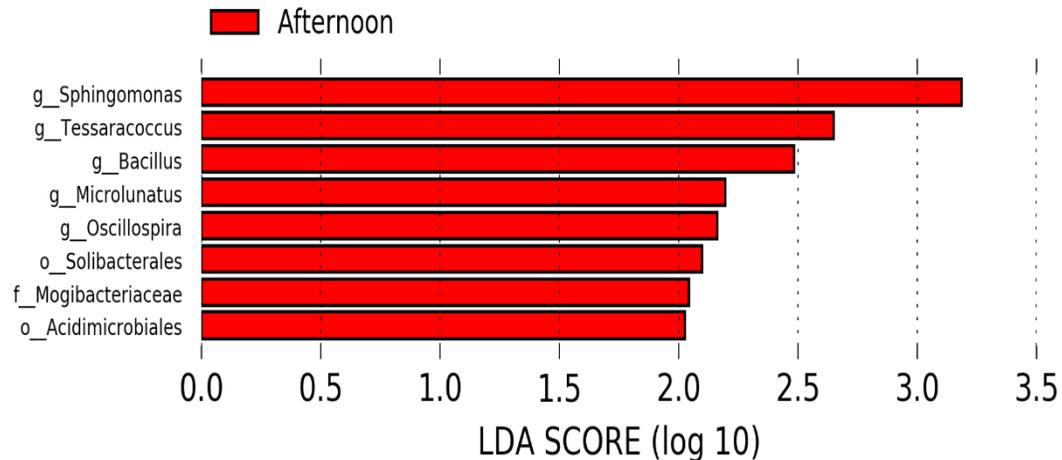


Fig. 11. Comparación Lefse (Linear discriminant analysis effect size) entre taxones bacterianos significativos entre leche materna entre leche materna en diferentes horarios del día ($p < 0.05$).

Se encontró que 8 grupos bacterianos significativamente diferentes entre sí en los horarios estimados previamente.

Diversidad α de la leche diferentes horarios del día

Los análisis de diversidad Alpha se usaron para cuantificar el número de especies bacterianas y su distribución dentro de cada muestra. a través del cálculo del número de OTUS observados y los índices de diversidad específica de Chao1, Shannon y Simpson. Con ellos se compararon las comunidades bacterianas presentes en los grupos de leche (mañana, tarde, noche).

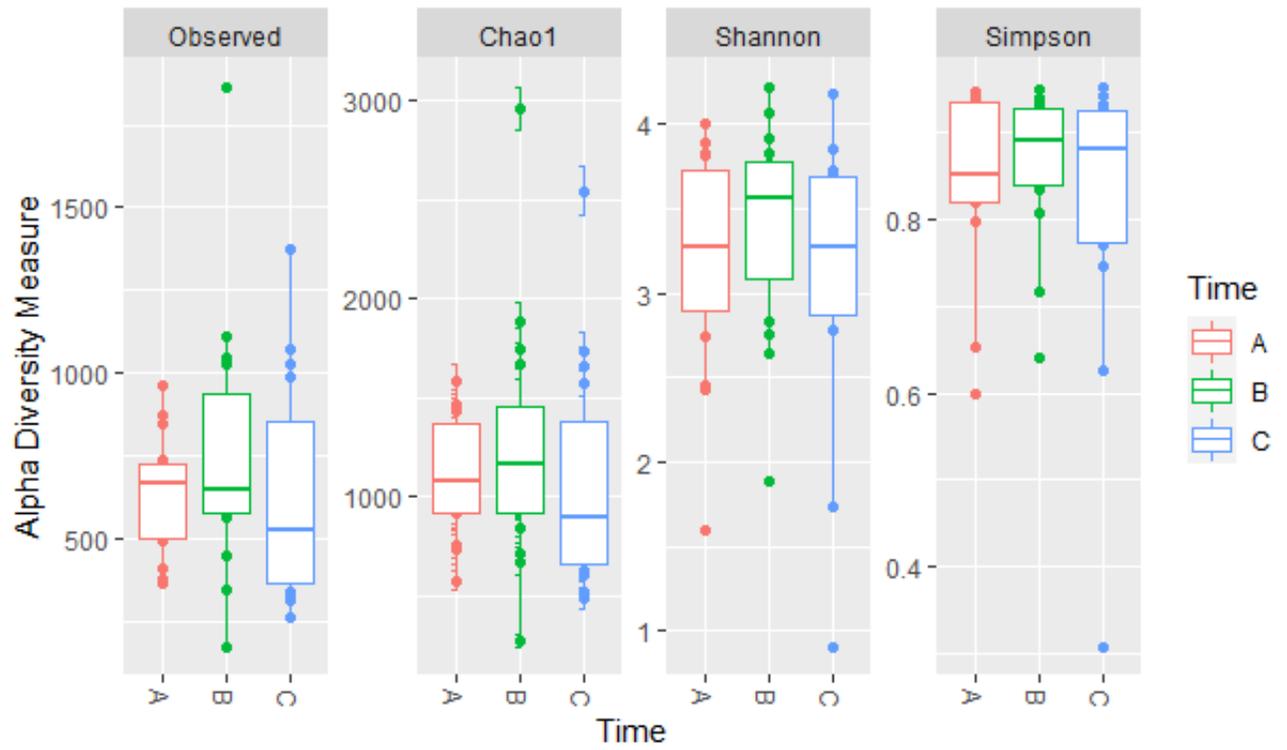


Fig. 12. Distribución de las muestras de leche de acuerdo con la diversidad alfa.

Diversidad β

La diversidad beta se utilizó para cuantificar y comparar el grado de diferenciación, también referido como distancia o similitud (análisis UniFrac) entre cada par de muestras. Para ello se calculó la distancia Weighted Unifrac entre las muestras pareadas para realizar el análisis de coordenadas principales (PCoA). Con base a este análisis (PCoA) observa que los grupos de leche no presentan diferencias entre ellos.

Cada punto representa a la comunidad bacteriana en muestras de leche presente en un horario específico, la comunidad bacteriana presente en la mañana esta representado en color naranja, la muestra representada en rojo es de las muestras tomadas en la tarde, las muestras en azul son representativas de la noche.

Por otro lado, los círculos de color rosa y morado representan las muestras de copro de las madres y los hijos respectivamente.

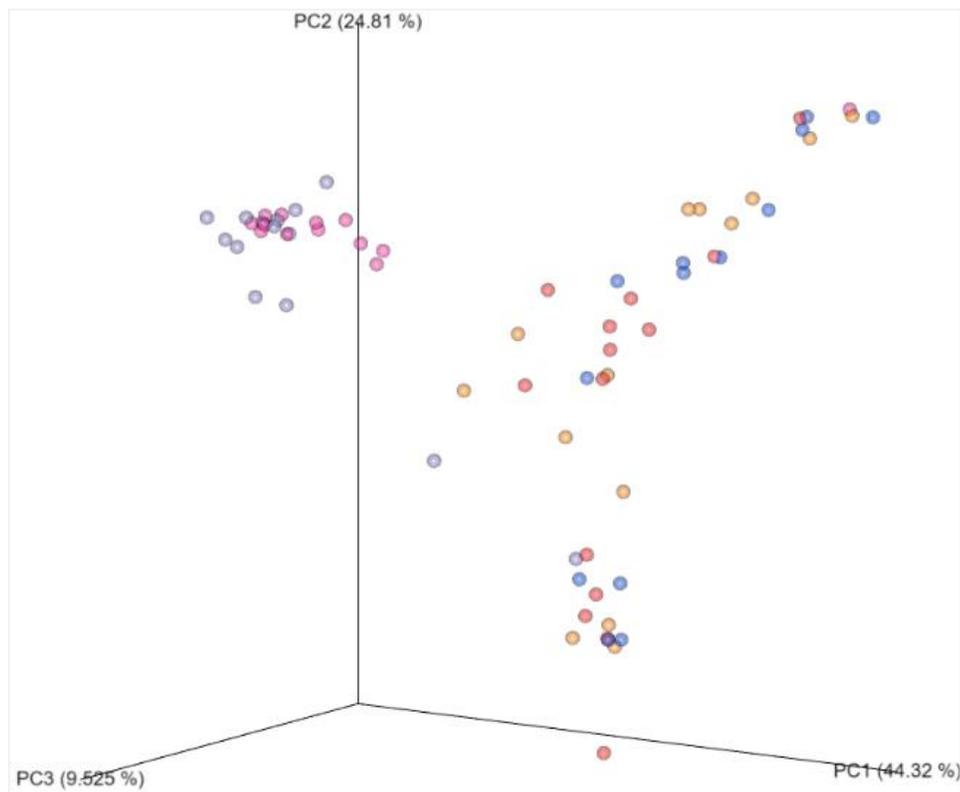


Fig. 13. Análisis de la microbiota presente en leche y heces en diferentes horarios

Heatmap

El análisis de heatmap fue utilizado para ver las taxas compartidos entre las 3 comunidades bacterianas estudiadas: la leche materna, copro del bebé, copro de la mamá

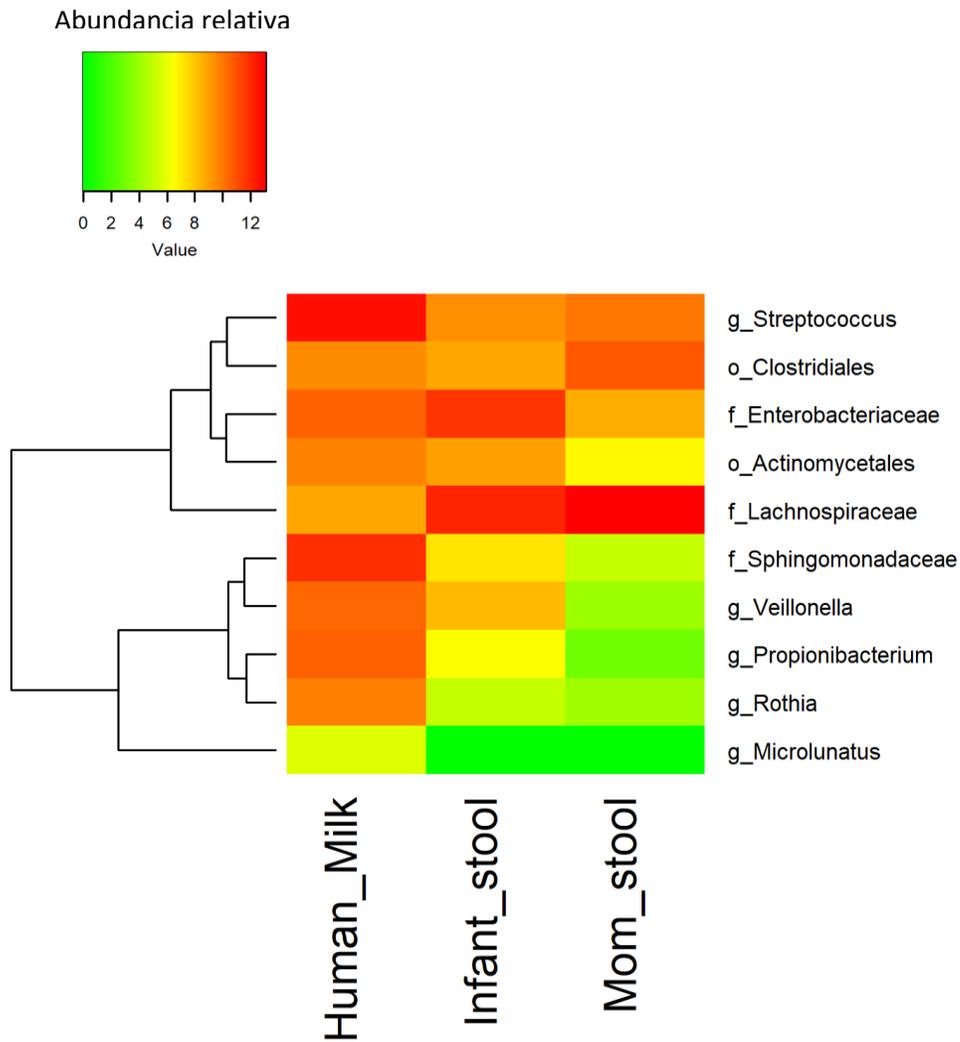


Fig. 14. Heat map de las muestras presentes en leche materna, copro de bebé, copro de la mamá

Predicción del metagenoma

La predicción de rutas metabólicas fue realizada por el programa PICRUST donde se ve favorecido en las proteínas del citoesqueleto (0.011) siendo favorecido en la mañana y en el metabolismo de glicerofosfolípidos (0.034) en todos los horarios, principalmente en el horario nocturno

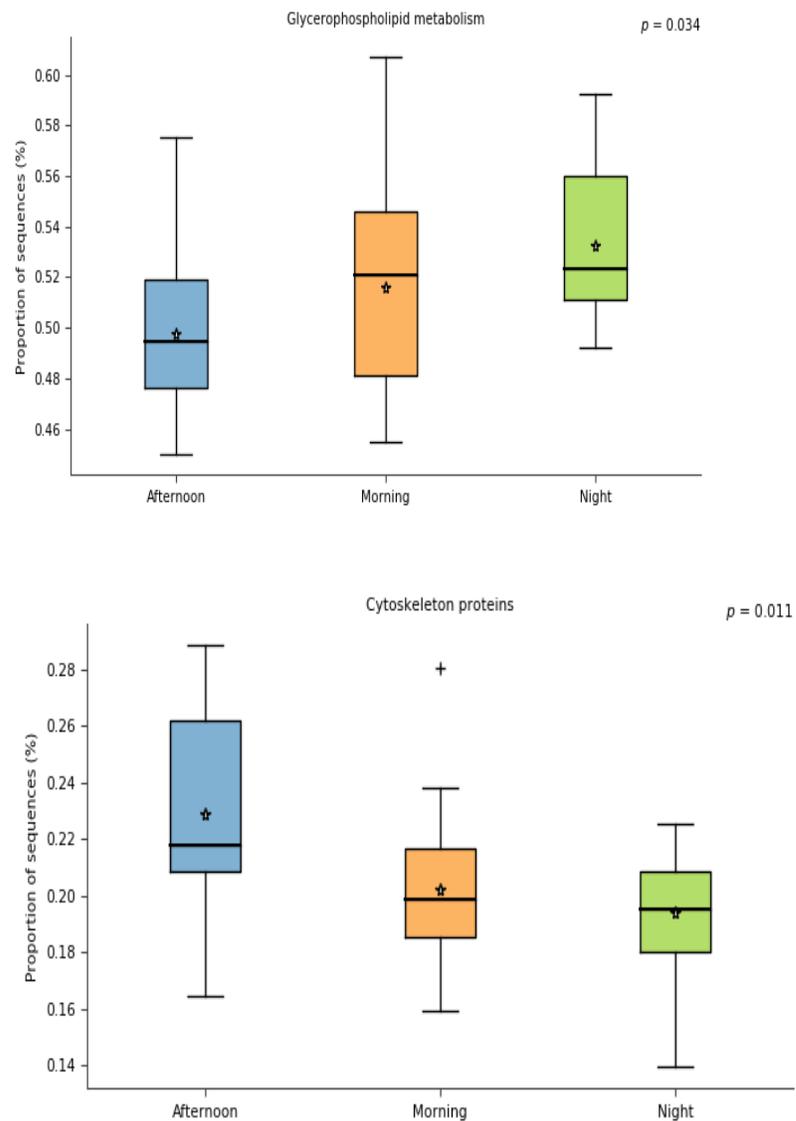


Fig. 15. Ruta metabólica favorecida de acuerdo al horario

Discusión

La microbiota presenta cambios en la composición bacteriana, los cuales modula muchas funciones importantes en el hospedero. Las fluctuaciones circadianas en algunos componentes bioactivos han sido previamente reportadas, estos cambios podrían transferir información cronobiológica de la madre al hijo para ayudar al desarrollo biológico del infante.

Los resultados de la abundancia bacteriana muestran que *Strephylococcus* y *Streptococcus* son las especies más abundantes en todos los horarios, en estudios de diversidad bacteriana en leche materna se ha observado que estas dos especies bacterianas se encuentran en todos los casos

Por otro lado, los resultados de abundancia muestran que los miembros de los phyla *Protobacteria*, *Actinobacteria* y *Firmicutes* son más abundantes en la noche, de igual manera se encuentra una mayor cantidad de OTUS en este horario. Estos resultados concuerdan con otros estudios en donde cambia la abundancia de ciertos grupos bacterianos en algunos organismos. En el análisis de abundancia en la microbiota de saliva muestra una predominancia del phylum *Actinobacteria* en personas sanas de la misma forma en que está presente en este estudio (Takayasu *et al* 2017). En otros estudios en ratón se determinó que miembros del phylum *Protobacteria* presenta oscilaciones de abundancia durante el día, con una mayor abundancia durante la noche (Thaiss *et al.*, 2014). Adicionalmente Firmicutes exhiben variaciones rítmicas en ciclos de 24 horas asociados con horarios alimenticios, mostrando que puede alterarse al cambiar los ciclos de luz y oscuridad en ratones. Finalmente, como ha sido previamente reportado, estos cambios pueden influenciar la composición de la microbiota del intestino del lactante, considerando

a la leche materna como la fuente principal y optima de alimento para los neonatos ya que es conocido que los infantes tienen una microbiota muy homogénea y la alimentación con leche materna moldeará la microbiota intestinal del lactante

Se han reportado resultados similares a los de este trabajo referente a la presencia de *Bifidobacteria*, la cual se encuentra predominantemente en niños alimentados por leche materna. *Bifidobacteria* se encuentra meses después del nacimiento y después se mantienen como una pequeña población.

Por otro lado *Kaistobacter* se encuentra en la mayor abundancia en las muestras de leche de la tarde, esta bacteria pertenece a la familia de *Sphingomonadaceae* la cual se ha reportado estar en tejido mamario de mujeres sanas, por esta razón se sugiere que tenga relación en el mantenimiento del tejido tegumentario de esa zona anatómica.

El análisis de los taxones diferenciales entre grupos nos indica la diferencia de la abundancia bacteriana en todos los horarios

(mañana,tarde,noche) sin embargo solo se muestran aquellas donde hay un cambio en su abundancia con significado estadístico.

Las muestras de Lefse tiene relación con la abundancia relativa donde familia de *Sphingomonadaceae* se encuentra expresada en la tarde en ambos casos.

Por otro lado se observa que algunas bacterias pertenecen a la familia de Actinobacterias, las cuales son importantes en la leche materna ya que favorecen a la producción de HMO

Los análisis de diversidad α nos muestran riqueza, diversidad y abundancia. Para determinar la riqueza de las especies bacterianas se utilizo el análisis de Chao1 y especies observadas donde no se observaron diferencias entre los grupos, al determinar la diversidad con el índice de Shannon se pudo observar que las especies eran altamente diversas, sin embargo al compararlo con el análisis de Simpson para dominancia se concluye que las muestras con igualmente dominantes, por lo que las muestras son equivalentes entre sí, siendo tanto diversas como dominantes sin que haya una especie que sobresalga de las otras.

Los análisis de diversidad β en la leche materna muestran que las muestras tienden a agruparse de acuerdo al horario sin embargo no existen diferencias significativas entre ellas, sin embargo, al analizar las muestras de copro, se puede observar que existen diferencias en madres y bebés, cabe destacar que cuanto más maduro es el bebé tiende a parecerse más al copro de la mamá.

El análisis por heatmap nos muestra las bacterias presentes en 3 ecosistemas diferentes (leche materna, copro del bebé y copro de la mamá) donde se encuentra las bacterias *Streptococcus*, *Clostriales*, *Sphingomonadaceae* y *Propionibacterium* estas bacterias corresponden a lo reportado por Corona-Cervantes *et al.* en el año 2020 donde esos mismos taxos se comparten tanto en leche materna como en el copro de los lactantes, en el caso de *Sphingomonadaceae* y *Propionibacterium* se encuentran en menor proporción en el copro del neonato, esto puede deberse a que son bacterias poco dominantes y por eso se encuentran en menor proporción en el copro de los lactantes

De acuerdo con la predicción del metagenoma el metabolismo de glicerofosfolípidos se encuentra en mayor expresión en la noche, se ha reportado que existen bacterias relacionadas al metabolismo, una de estas bacterias es *Staphylococcus*, la cual está relacionada con 3 metabolitos presentes en la leche materna (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina), lo cual coincide con las abundancias relativas donde la especie más predominante en la noche es *Staphylococcus*,

Conclusiones

Así como componentes de la leche se ven afectados por los ciclos circadianos. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que la leche materna presenta cambios en su comunidad microbiana a lo largo del día, pero no existen cambios significativos en su diversidad. Sin embargo este trabajo presenta un número de participantes limitado, al aumentarlo podría generarse resultados más conclusivos

Perspectivas

Se espera que al aumentar el número de participantes se vea un cambio en la diversidad relacionado al horario, por otra parte, se busca analizar otros componentes de la leche como miRNAs e IgA2 donde se espera encontrar fluctuaciones a lo largo del día

Cronograma de trabajo

En el siguiente cronograma de trabajo, realizado con el programa bioinformático Gantt Project se muestran las actividades realizadas para la realización de la tesis, el color verde muestra el periodo durante el cual no se pudo trabajar en el laboratorio del Cinvestav, debido a la contingencia de SARS-CoV 2

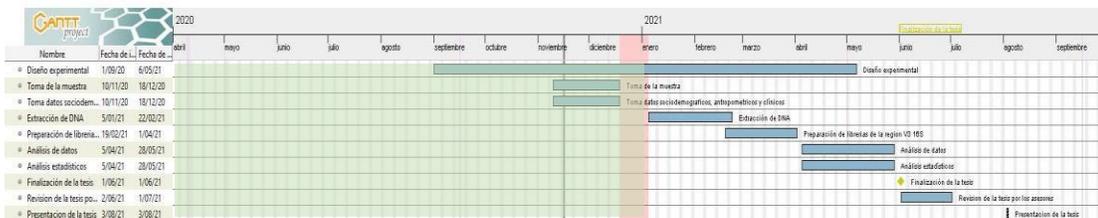


Fig. 16. Cronograma de trabajo para la realización de la tesis de maestría

Referencias

1. Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., ... & Wang, J. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell host & microbe*, *17*(5), 690-703.
2. Blaser, M. J., & Falkow, S. (2009). What are the consequences of the disappearing human microbiota?. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(12), 887-894.
3. Costantini, C., Renga, G., Sellitto, F., Borghi, M., Stincardini, C., Pariano, M., ... & Romani, L. (2020). Microbes in the era of circadian medicine. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 30
4. Corona-Cervantes, K., García-González, I., Villalobos-Flores, L. E., Hernández-Quiroz, F., Piña-Escobedo, A., Hoyo-Vadillo, C., & García-Mena, J. (2020). Human milk microbiota associated with early colonization of the neonatal gut in Mexican newborns.
5. Curtis, A. M., Bellet, M. M., Sassone-Corsi, P., & O'Neill, L. A. (2014). Circadian clock proteins and immunity. *Immunity*, *40*(2), 178-186.
6. Debelius, J., Song, S. J., Vazquez-Baeza, Y., Xu, Z. Z., Gonzalez, A., & Knight, R. (2016). Tiny microbes, enormous impacts: what matters in gut microbiome studies?. *Genome biology*, *17*(1), 217
7. Gibbs, J. E., & Butler, T. D. (2020). Circadian host-microbiome interactions in immunity. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1783.
8. Donovan, S. M., & Comstock, S. S. (2016). Human milk oligosaccharides influence neonatal mucosal and systemic immunity. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *69*(Suppl. 2), 41-51
9. Dunne-Castagna, V. P., Mills, D. A., & Lönnerdal, B. (2020). Effects of milk secretory immunoglobulin A on the commensal microbiota. *Milk, Mucosal Immunity and the Microbiome: Impact on the Neonate*, *94*, 158-168.
10. Derrien, M., Alvarez, A. S., & de Vos, W. M. (2019). The gut microbiota in the first decade of life. *Trends in microbiology*, *27*(12), 997-1010.
11. Elizabeth Thursby, Nathalie Juge; Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* 1 June 2017; 474 (11): 1823–1836. doi: <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
12. Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., & Rodríguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological research*, *69*(1), 1-10.
13. Funkhouser, L. J., & Bordenstein, S. R. (2013). Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS biology*, *11*(8), e1001631.
14. Hahn-Holbrook, J., Saxbe, D., Bixby, C., Steele, C., & Glynn, L. (2019). Human milk as “chrononutrition”: implications for child health and development. *Pediatric research*, *85*(7), 936-942.
15. Italianer, M. F., Naninck, E. F., Roelants, J. A., van der Horst, G. T., Reiss, I. K., Goudoever, J. B. V., ... & Vermeulen, M. J. (2020). Circadian Variation in Human Milk Composition, a Systematic Review. *Nutrients*, *12*(8), 2328.
16. Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Rochat, F., & Chassard, C. (2014). Vertical mother–neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental microbiology*, *16*(9), 2891-2904.

17. Liang, X., Bushman, F. D., & FitzGerald, G. A. (2015). Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(33), 10479-10484.
18. Li, Y., Hao, Y., Fan, F., & Zhang, B. (2018). The role of microbiome in insomnia, circadian disturbance and depression. *Frontiers in psychiatry*, *9*, 669.
19. Moeller, A. H., Caro-Quintero, A., Mjunga, D., Georgiev, A. V., Lonsdorf, E. V., Muller, M. N., ... & Integrative, H. M. P., Proctor, L. M., Creasy, H. H., Fettweis, J. M., Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., ... & Weinstock, G. M. (2019). The integrative human microbiome project. *Natur*, *569*(7758), 641-648.
20. McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS one*, *8*(4), e61217.
21. Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A., ... & Baker, C. C. (2009). The NIH human microbiome project. *Genome research*, *19*(12), 2317-2323.
22. Rijo-Ferreira, F., & Takahashi, J. S. (2019). Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome medicine*, *11*(1), 1-16.
23. Ochman, H. (2016). Cospeciation of gut microbiota with hominids. *Science*, *353*(6297), 380-382
24. Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*, *5*(7), e177.
25. Pflughoeft, K. J., & Versalovic, J. (2012). Human microbiome in health and disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *7*, 99-122
26. Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2928.
27. Qi, C., Ding, M., Xiao, H., Li, D., Chen, D., Zhou, Q., ... & Sun, J. (2021). Co-occurrence of Secretory Immunoglobulin A-Coated Bacteria in Maternal Gut, Breast Milk, and Infant Gut in Humans.
28. Summa, K. C., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., Shaikh, M., Cavanaugh, K., Tang, Y., ... & Keshavarzian, A. (2013). Disruption of the circadian clock in mice increases intestinal permeability and promotes alcohol-induced hepatic pathology and inflammation. *PLoS one*, *8*(6), e67102.
29. Scheiermann, C., Gibbs, J., Ince, L., & Loudon, A. (2018). Clocking in to immunity. *Nature Reviews Immunology*, *18*(7), 423-437.
30. Segata N., Izard J., Waldron, L., Gevers., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*, *12*(6) R60
31. Takayasu, L., Suda, W., Takanashi, K., Iioka, E., Kurokawa, R., Shindo, C., ... & Hattori, M. (2017). Circadian oscillations of microbial and functional composition in the human salivary microbiome. *DNA Research*, *24*(3), 261-270.
32. Thaïss, C. A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, A. C., ... & Kuperman, Y. (2014). Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*, *159*(3), 514-529.
33. Trinder, M., Bisanz, J. E., Burton, J. P., & Reid, G. (2015). Bacteria Need Sleep Too?: Microbiome Circadian Rhythmicity, Metabolic Disease, and Beyond. *University of Toronto Medical Journal*, *92*(3), 52-55.
34. Togo, A., Dufour, J. C., Lagier, J. C., Dubourg, G., Raoult, D., & Million, M. (2019). Repertoire of human breast and milk microbiota: a systematic review. *Future microbiology*, *14*(7), 623-641.
35. Pearson, J. A., Wong, F. S., & Wen, L. (2020). Crosstalk between circadian rhythms and the microbiota. *Immunology*, *161*(4), 278-290.
36. Perez, P. F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., ... & Donnet-Hughes, A. (2007). Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells?. *Pediatrics*, *119*(3), e724-e732.
37. Volery, M., Scherz, V., Jakob, W., Bandeira, D., Deggim-Messmer, V., Lauber-Biason, A., ... & Zimmermann, P. (2020). Study protocol for the ABERRANT study: antibiotic-induced disruption of the maternal and infant microbiome and adverse health outcomes—a prospective cohort study among children born at term. *BMJ open*, *10*(6), e036275.
38. Voigt, R. M., Forsyth, C. B., Green, S. J., Mutlu, E., Engen, P., Vitaterna, M. H., ... & Keshavarzian, A. (2014). Circadian disorganization alters intestinal microbiota. *PLoS one*, *9*(5), e97500.
39. Wopereis, H., Oozeer, R., Knipping, K., Belzer, C., & Knol, J. (2014). The first thousand days—intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatric Allergy and Immunology*, *25*(5), 428-438

Suplementarias

Protocolo de kit de extracción de DNA de leche

1. Transferir 1 ml de leche a un tubo de microcentrífuga y centrifugar a toda velocidad por 3 min. Descartar el sobrenadante incluyendo la grasa en la parte superior después de la centrifugación y usar un algodón para remover algún remanente del tubo de microcentrífuga.
2. Añadir 425 µl de Buffer de Lisis MB1 y 30 µl de solución de la lisozima (20 mg/ml) y mezclar bien por vortex. Incubar a 37° C por 30 minutos.
3. Añadir 425 µl de Buffer MB2 y 20 µl de Proteinasa (20 mg/ml) y mezclar vigorosamente por vortex. Incubar a 60° C de 30-60 minutos.
4. Añadir 450 µl de etanol (96- 100%) a la mezcla. Mezclar vigorosamente por vortex por 10 segundos. Descartar el sobrenadante.
5. Colocar la columna de unión con el tubo de colección. Transferir 750 µl de la muestra a la columna de unión y centrifugar a toda velocidad por un minuto. Descartar el sobrenadante y colocar la columna de unión con el tubo de colección.
6. Repetir el paso 5 para la muestra restante. Colocar la columna de unión a un nuevo tubo de colección.
7. Añadir 400 µl de W1 Buffer a la columna de unión y centrifugar a toda velocidad por 30 segundos. Descartar el sobrenadante y poner la columna de unión con la de colección.
8. Añadir 650 µl de Wash Buffer a la columna de unión y centrifugar a toda velocidad por 1 minuto. Descartar el sobrenadante y colocar la columna de unión de regreso al tubo de colección.
9. Repetir el paso 8 una vez más para lavar.
10. Centrifugar a toda velocidad unos 3 minutos adicionales para secar la columna de unión completamente.
11. Colocar la columna de unión al tubo de elución. Añadir de 50-100 µl de Buffer de Elución precalentado al centro de la membrana de la columna unión y mantenerlo por 3 minutos.
12. Centrifuga a toda velocidad por un minuto par eluir en DNA total. Almacenar un total de DNA a 4° C o -20° C.

La concentración de DNA total se determinó mediante el cociente de absorbancia 260/280 utilizando el equipo Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Protocolo de kit de extracción de DNA de copro

1. Añadir de 50 a 100 mg de muestra de copro en un tubo de perlas y después colocarlo en hielos.
--Si la muestra es líquida, añadir 200 µl de muestra en un tubo de perlas de 2.0 ml.
2. Añadir 300 µl de SDE1 Buffer y 20 µl de proteinasa K (10mg/ml) a la muestra, mezclar con el vórtex a toda velocidad por 5 minutos. Incubar la mezcla a 70° C por 10 minutos y mezclar con vortex dos veces durante la incubación.
3. Girar el tubo para remover las gotas al interior de tubo.
4. Enfriar la muestra y añadir 100 µl de Buffer SDE2 a la muestra, mezclar bien por vortex. Incubar la muestra en hielo por 5 minutos.
5. Centrifugar a toda velocidad (14,000 rpm o 10,000 x g) por 5 minutos.
6. Cuidadosamente transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml microcentrifuga y descartar la pastilla de copro.
7. Añadir 200 µl de Buffer SDE3 a la muestra, mezclar bien por vortex, incubar la muestra a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a toda velocidad (14,000 rpm o 10,000 x g) por 2 minutos.
9. Cuidadosamente transferir 250 µl del sobrenadante a un tubo de 1.5 ml limpio y descartar la pastilla.
10. Brevemente girar el tubo para remover las gotas al interior del tubo.
11. Añadir 250 µl del Buffer SDE4 y 250 µl de etanol (96 – 100%) a la muestra y mezclar por vortex.
12. Colocar una columna SDE en un tubo de colección y transferir toda la muestra en una columna de SDE. Centrifugar a toda velocidad (14,000 rpm o 10,000 x g) por 1 min y después descartar el sobrenadante. Colocar la columna SED en un nuevo tubo de colección

13. Añadir 750 μ l de Buffer de Lavado (con etanol añadido) a una columna de SDE. Centrifugar a toda velocidad (14,000 rpm o 10,000 xg) por 1 minuto y después descartar el sobrenadante. Repetir este paso una vez más.
14. Centrifugar a toda velocidad (14,000 rpm o 10,000 x g) por 3 minutos adicionales para secar la columna SDE.
15. Colocar la columna ADE en un tubo de Elución. Añadir de 50 a 200 μ l de Buffer de Elución pre-calentado y colocarlo en el centro de la membrana de la columna SDE. Mantener la columna de SDE por 2 min a temperatura ambiente.
16. Centrifugar por 1 minuto para eluir DNA.

CONSENTIMIENTO DE LA PARTICIPANTE

Por medio del presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE LA MICROBIOTA DE LA LECHE MATERNA A LO LARGO DEL DÍA. El propósito de esta investigación es conocer la variación de la microbiota presente en la leche materna en diferentes horas del día. Se me ha explicado que mi participación consistirá en: donar una muestra copro y 3 muestras de leche materna, así como una muestra de copro de mi bebé, por 5 días para obtener DNA bacteriano que habrá de congelarse. Declaro que se me han informado los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio y que son los siguientes: el donar una muestra de copro y leche materna, así como una muestra de copro de mi bebé. El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier situación derivada de los resultados que pudiera ser ventajosa para mi salud y la de mi bebé; así como responder a cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán al cabo, los riesgos y beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento. Además, de informarme los resultados de la investigación. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que yo lo considere conveniente. El investigador principal me ha dado seguridad que no será identificada en presentaciones o publicaciones que deriven del estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esto pudiera hacerme cambiar de opinión respecto de mi permanencia en el mismo. Al firmar este documento, doy permiso para usar mis muestras para los fines que el consentimiento describe. Al firmar este documento no renuncio a ninguno de mis derechos legales.

Declaro que no padezco algún padecimiento crónico que pueda ser agravado por mi participación, por lo que no haré responsable al investigador, al proyecto, al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por algún accidente o problema en mi salud durante y después de mi participación en este proyecto.

Nombre completo del paciente:
Betty Geraldine Quevedo Contreras
 Correo electrónico bgquevedo2@gmail.com
 Dirección: Salaverry 834, Int 301, Lindavista
 Teléfono: 55 4191 9391
 Fecha: 28 Nov 2020

Firma: _____

Nombre completo del Testigo 1:
Luis Eduardo Fernandez Guillen
 Correo electrónico 55 8794 4545
 Dirección: Salaverry 834, Int 301, Lindavista
 Teléfono: LUISFER.433.76@gmail.com
 Fecha: 28 Nov 2020

Firma: _____

Nombre completo del Testigo 2:
Juan Manuel Velazquez
 Correo electrónico juanvelazquez96@outlook.com
 Dirección: Salaverry 834, Int 301, Lindavista
 Teléfono: 55 11 38 90 55
 Fecha: 28/11/2020

Firma: _____

Nombre del investigador: Dr. Jaime García Mena.
 Correo electrónico: correo electrónico:
jpgmena@cinvestav.mx; norma.zavala@cinvestav.mx
 Dirección: Av IPN 2508, Col Zacatenco, México CDMX
 07360
 Teléfono: (55) 58473800 X5328
 Fecha: _____

Firma: _____

CONSENTIMIENTO DE LA PARTICIPANTE

Por medio del presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE LA MICROBIOTA DE LA LECHE MATERNA A LO LARGO DEL DÍA. El propósito de esta investigación es conocer la variación de la microbiota presente en la leche materna en diferentes horas del día. Se me ha explicado que mi participación consistirá en: donar una muestra copro y 3 muestras de leche materna, así como una muestra de copro de mi bebé, por 5 días para obtener DNA bacteriano que habrá de congelarse. Declaro que se me han informado los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio y que son los siguientes: el donar una muestra de copro y leche materna, así como una muestra de copro de mi bebé. El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier situación derivada de los resultados que pudiera ser ventajosa para mi salud y la de mi bebé; así como responder a cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán al cabo, los riesgos y beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento. Además, de informarme los resultados de la investigación. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que yo lo considere conveniente. El investigador principal me ha dado seguridad que no seré identificada en presentaciones o publicaciones que deriven del estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esto pudiera hacerme cambiar de opinión respecto de mi permanencia en el mismo. Al firmar este documento, doy permiso para usar mis muestras para los fines que el consentimiento describe. Al firmar este documento no renuncio a ninguno de mis derechos legales.

Declaro que no padezco algún padecimiento crónico que pueda ser agravado por mi participación, por lo que no haré responsable al investigador, al proyecto, al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por algún accidente o problema en mi salud durante y después de mi participación en este proyecto.

Nombre completo del paciente:
Ilse Tassi Arellano Vázquez.
 Correo electrónico ilse.yassi.av@gmail.com
 Dirección: Pt. The Regent, Costa del Este, Ciudad de Panamá
 Teléfono: +507 63240867
 Fecha: 30.11.20

Firma: 

Nombre completo del Testigo 1:
Randy Ser Llanas Vázquez
 Correo electrónico randy.llanas@hotmail.com
 Dirección: Calle 30 A #91 col. Santa Rosa
 Teléfono: 5534960605
 Fecha: 30/11/2020

Firma: 

Nombre completo del Testigo 2:
Ana Ma. Vázquez Méndez.
 Correo electrónico yalilse7@hotmail.com
 Dirección: NAUCALPAN #75. NVA. IXTACIACA
 Teléfono: 5535077900
 Fecha: 30/NOV./20

Firma: 

Nombre del investigador: Dr. Jaime García Mena.
 Correo electrónico: correo electrónico:
igmena@cinvestav.mx; norma.zavala@cinvestav.mx
 Dirección: Av IPN 2508, Col Zacatenco, México CDMX
 07360
 Teléfono: (55) 58473800 X5328
 Fecha: _____

Firma: _____

CONSENTIMIENTO DE LA PARTICIPANTE

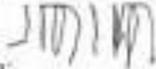
Por medio del presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE LA MICROBIOTA DE LA LECHE MATERNA A LO LARGO DEL DÍA. El propósito de esta investigación es conocer la variación de la microbiota presente en la leche materna en diferentes horas del día. Se me ha explicado que mi participación consistirá en: Autorizar el uso de una muestra copro y 3 muestras de leche materna, así como una muestra de copro de mi bebé, por 5 días para obtener DNA bacteriano que habrá de congelarse. Declaro que se me han informado los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio y que son los siguientes: el donar una muestra de copro y leche materna, así como una muestra de copro de mi bebé. El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier situación derivada de los resultados que pudiera ser ventajosa para mi salud y la de mi bebé; así como responder a cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le planteé acerca de los procedimientos que se llevarán al cabo, los riesgos y beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento. Además, de informarme los resultados de la investigación. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que yo lo considere conveniente. El investigador principal me ha dado seguridad que no será identificada en presentaciones o publicaciones que deriven del estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esto pudiera hacerme cambiar de opinión respecto de mi permanencia en el mismo. Al firmar este documento, doy permiso para usar mis muestras para los fines que el consentimiento describe. Al firmar este documento no renuncio a ninguno de mis derechos legales.

Declaro que no padezco algún padecimiento crónico que pueda ser agravado por mi participación, por lo que no haré responsable al investigador, al proyecto, al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por algún accidente o problema en mi salud durante y después de mi participación en este proyecto

Nombre completo del paciente:

Itzel Salinas AraucCorreo electrónico: itzelsalinas9956@gmail.comDirección: madreselvas 595 Villa de las F. CoahuilaTeléfono: 55-51-63-56-82Fecha: 27 febrero - 2021Firma: 

Nombre completo del Testigo 2:

Juan Manuel Telas MontesCorreo electrónico: comunicante169@gmail.comDirección: madreselvas 595 Villa de las F. CoahuilaTeléfono: 55-13-92-46-76Fecha: 27 Feb - 2021Firma: 

Nombre completo del Testigo 1:

Evelyn Salinas AraucCorreo electrónico: ing_evsalinas@hotmail.comDirección: madreselvas 595 Villa de las F. CoahuilaTeléfono: 55-44-87-91-14Fecha: 27 Feb - 2021Firma: 

Nombre completo del investigador:

Norma Leticia Torres CervantesCorreo electrónico: lfc68@hotmail.comDirección: Av. Naciones #2, Comisariat Veracruz 904Teléfono: 55-76-85-81-70Fecha: 27 Feb 2021Firma: 