



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

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Caracterización de la microbiota unida a inmunoglobulinas en  
leche humana e intestino infantil en población mexicana”**

**TESIS**

Que presenta

**M en C. Karina Corona Cervantes**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Directores de Tesis

**Dr. Jaime García Mena**

**Dr. Leopoldo Santos Argumedo**

**Ciudad de México**

**Octubre del 2022**

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco, 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 y en el laboratorio 1 de Del Departamento de Biomedicina bajo la dirección del Dr. Leopoldo Santos Argumedo Parte del trabajo se realizó en el Hospital regional de Alta especialidad de Ixtapaluca (HREI) y en el Hospital general José María Rodríguez en Ecatepec de Morelos Estado de México



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 a la Lic. Viridiana Rosas Osegueda por su apoyo administrativo.

Para la realización de este trabajo se recibió apoyo del CONACyT-163235 INFR-2011-01 y 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 al Dr. Jaime García Mena.

Durante el desarrollo de este trabajo Karina Corona Cervantes fue becaria de doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) beca 777953 durante el período de Septiembre del año 2018 a Agosto del año 2022.

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **ASESORES**

Dr. José Efraín Garrido Guerrero  
Departamento de Genética y Biología Molecular  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

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

### **ASESOR EXTERNO AL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

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

### **ASESOR EXTERNO AL CINVESTAV**

Dra. Paola Berenice Zarate Segura  
Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional  
Ciudad de México

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca Doctoral con el número de registro 589746 que me proporcionó y por los fondos otorgados para este proyecto. Agradezco al Cinvestav-IPN por el apoyo otorgado para los cursos curso de especialización, los congresos y el apoyo extraordinario para terminar mi formación.

Agradezco a los doctores Dr. Gustavo Acosta Altamirano y Dra. Mónica Sierra por su colaboración en el aporte de muestras para este proyecto, y a la M en C. Mariana Joaquín por su ayuda en trámites administrativos del HREI. Al Dr. Martín Noé Rangel Calvillo por proporcionarnos muestras en el Hospital General de Ecatepec José María Rodríguez. A la Bióloga Selene Gonzáles Ruiz, a la Dra. Arlette Espinoza y al Dr. David Cruz Zárate por su apoyo en los experimentos de citometría de flujo y análisis de datos de citometría. Se agradece la participación de todas las madres y a los bebés donadores de participantes de este estudio, sin su participación, no se pudiera haber logrado este proyecto. A mi comité tutorial por sus aportaciones y comentarios que enriquecieron y mejoraron mi trabajo, al Dr. Jaime García Mena por su asesoría y acompañamiento a lo largo de mi posgrado, por las gestiones administrativas, su conocimiento y las oportunidades de trabajar en otros proyectos enriquecedores. Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo por sus valiosos aportes al trabajo y sus consejos profesionales. Al Dr. Erick Sánchez Salguero por toda la ayuda con las técnicas de inmunología, por toda su paciencia y su invaluable aporte a este trabajo y de manera personal. A la M en C. Gabriela Zavala por su valioso tiempo y apoyo en la colecta de muestras y el procesamiento MACS en el hospital de Ixtapaluca. Al biólogo Alberto Piña por su apoyo en la secuenciación y sus muy útiles consejos. A todos mis compañeros del laboratorio 0, porque de alguna u otra manera contribuyeron al avance de este trabajo, a mi desarrollo profesional y personal. Gracias a Nacho, quien incondicionalmente estuvo a mi lado en todo este proceso. Alicia por apoyarme de una u otra manera. A mi familia por su cariño y apoyo en todo momento. Por Último, a HaShem mi razón de ser, Todá Rabá Hashem.

## RESUMEN

El calostro humano, es la primera secreción producida en los primeros 2-4 días después del parto, contiene factores que contribuyen mayormente a la defensa y estimulación inmune del recién nacido más que a su nutrición. Entre los componentes de la leche materna se encuentran bacterias con potencial probiótico que son un inóculo para la nueva microbiota adquirida por el neonato. La microbiota en la leche humana tiene una composición bacteriana variada, influenciada por diferentes factores, como estatus económico, alimentación y tipo de parto. Así que, por lo anterior, es importante caracterizar la microbiota en mujeres mexicanas y neonatos que reciben esta leche. Además de bacterias, la madre proporciona al recién nacido una gran cantidad de inmunoglobulinas que no solo contribuyen a la inmunidad, si no también juegan un papel en la homeostasis, la tolerancia y el establecimiento de la microbiota en el infante. En homeostasis se ha visto que ciertos géneros bacterianos en el calostro están asociados con subtipos 1 y 2 de la inmunoglobulina A y poco se conoce sobre inmunoglobulinas como IgM e IgG en el reconocimiento de la microbiota en calostro e intestino del bebé. Así, en este trabajo se estudió las bacterias del calostro de mujeres sanas, así como aquellas recubiertas por IgA1 e IgA2 y otras inmunoglobulinas secretadas en el calostro como IgM e IgG. También se caracterizó la microbiota del copro de neonatos alimentados con lactancia exclusiva, donde al igual que en calostro las bacterias que se encontraban unidas a inmunoglobulinas maternas se identificaron mediante secuenciación masiva para conocer más sobre la relación microbiota – hospedero en los primeros días de vida. Se encontró una gran diversidad de bacterias en la leche materna de mujeres mexicanas especialmente proteobacterias y en el copro del neonato también se encontró un gran grupo de comensales, sugiriendo que provienen de la leche materna. También se describió que IgA2 e IgM unen preferentemente a proteobacterias del calostro humano, principalmente a grupos pertenecientes a alfa y beta proteobacteria que suelen encontrarse en baja frecuencia en el intestino humano y la glándula mamaria. Estos grupos se caracterizan por alta biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, que inducirían respuestas positivas en el sistema inmune del neonato. En cambio, IgG unió bacterias frecuentemente reportadas como parte de la microbiota inicial, que tienen un alta biosíntesis de nucleótidos, relacionándose con mecanismo de colonización, probablemente para regular su diseminación en el intestino neonatal. Por otra parte, IgA2 e IgM unen grupos productores de butirato necesarios en la colonización tardía, probablemente para ayudarlos a anclarse al mucus intestinal. Estos resultados aportan información sobre la microbiota en los primeros días y su relación con el sistema inmune neonatal.

## SUMMARY

Human colostrum, is the first secretion produced in the first 2-4 days after delivery, contains different factors that mainly contribute to the defense of the newborn, rather than to its nutrition. Among of other components, human milk contains probiotic bacteria, which acts as an inoculum for the recent acquired microbiota by the newborn. The microbiota in human milk its different and change according to different factors, in particular economic status, nutrition, and delivery mode. Therefore, it is important to characterize the microbiota in Mexican women milk, also the gut microbiota of the neonates who receive this milk. Besides to bacteria, the mother supplies a large amount immunoglobulin to the newborn, that not only contribute to the defense of the new being, but also play a role in homeostasis, tolerance, and the establishment of the new microbiota in the infant. Under homeostasis condition, certain bacterial genera in colostrum have been associated with subtypes of immunoglobulin A (IgA1 and IgA2), but little is known about the role of other immunoglobulins such as IgM and IgG in the recognition of commensals in colostrum and in the baby's intestine. Therefore, the aim of this work was to characterize the microbiota of the colostrum of healthy Mexican women, as well as the bacteria that are coated with the IgA subtypes (IgA1 and IgA2) and other immunoglobulins secreted into the colostrum such as IgM and IgG. In the same way, the gut microbiota of exclusively breastfed newborns was characterized through the analysis of stool samples and as in colostrum samples, the maternal immunoglobulins bound bacteria were identified using the Ig-Seq technique, to learn more about the microbiota-host relationship in the first days of life. As a result, a great diversity of bacteria was found in the human colostrum of Mexican women, especially proteobacteria, and a large group of commensals was also found in the newborn's stool, which, it is suggested, largely come from human milk. It was also described in this work that IgA2 and IgM preferentially bind groups to these proteobacteria in human colostrum, mainly those belonging to alpha and beta proteobacteria that are usually found as low frequency taxa in human intestine and mammary glands. These bacteria are characterized by a high biosynthesis of long-chain fatty acids, which could be playing a role in inducing responses in the newborn's immune system. Instead, IgG binds to bacteria frequently reported as part of the initial microbiota, which present a high nucleotide biosynthesis pathway, which has been associated with colonization mechanisms. The IgG binding probably help to regulate the bacterial dissemination through the neonatal intestine, limiting its expansion. On the other hand, IgA2 and IgM coats butyrate-producing groups necessary for late colonization, probably to help them anchor to intestinal mucus. These results provide information about the neonate initial microbiota and its relationship with the infant's immune system.

## ÍNDICE

Índice de Tablas.....	10
Índice de Figuras.....	10
1 INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Composición de la leche materna .....	12
1.2 Microbiota de la leche materna .....	13
1.3 Interacción microbiota- hospedero.....	15
1.4 Inmunoglobulinas maternas .....	16
1.5 Secreción de Inmunoglobulinas en leche materna e Intestino .....	19
1.6 Tipos de unión de las inmunoglobulinas a microbiota.....	20
1.7 Mecanismos de respuesta por inmunoglobulinas a la microbiota .....	20
1.8 Microbiota del neonato en los primeros días.....	23
1.9 Adaptación del neonato a la colonización y el papel de la leche materna	25
2 ANTECEDENTES .....	27
2.1 Inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG y su relación con la microbiota.....	27
3 JUSTIFICACIÓN .....	32
4 ALCANCE.....	32
5 HIPOTESIS .....	33
6 OBJETIVO GENERAL.....	33
7 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	33
8 METODOLOGÍA DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
8.1 Diseño y tipo de estudio.....	34
8.1.1 Criterios de Inclusión de las Madres.....	34
8.1.2 Criterios de Exclusión de las madres .....	34
8.1.3 Criterios de inclusión de los neonatos/infantes .....	34
8.1.4 Criterios de Exclusión.....	35
8.1.5 Criterios de eliminación .....	35
8.2 Cálculo tamaño de muestra .....	35
8.3 Toma de muestra .....	35
8.4 Pretratamiento de la muestra.....	37
8.5 Cuantificación de inmunoglobulinas por ELISA .....	37
8.6 Tinción bacteriana para separación por citometría de Flujo (FACS).....	38

8.7	Separación de bacterias en fracciones por citometría de flujo.....	39
8.8	Tinción para Separación con perlas magnéticas (MACS).....	40
8.9	Separación bacteriana en fracciones con perlas Magnéticas (MACS) ....	40
8.10	Citometría de Flujo.....	41
8.10.1	Controles de citometría .....	41
8.11	Extracción y purificación de DNA genómico .....	42
8.12	Amplificación de la región V3 del rDNA 16S. ....	42
8.13	Preparación de Genotecas y Secuenciación Masiva .....	44
8.14	Análisis de secuencias, filtros y asignación taxonómica .....	45
8.15	Filtrado de ASVs Contaminantes y Abundancias relativas .....	45
8.16	Determinación de diversidad Alfa y Beta .....	46
8.17	Análisis de predicción de vías metabólicas de la microbiota por PICRUST2 46	
8.18	Análisis de Source Tracking.....	46
8.19	Correlación de metadatos con la microbiota .....	47
8.20	Análisis estadístico de la microbiota. ....	47
9	RESULTADOS .....	48
9.1	Características de la población estudiada.....	48
9.2	Obtención de fracciones bacterianas unidas a Inmunoglobulinas por FACS 49	
9.3	Composición de la microbiota unida a inmunoglobulinas en calostro. ....	50
9.4	Diversidad Bacteriana en muestras de calostro .....	52
9.5	Diferencias taxonómicas en la microbiota de calostro y muestras de heces con base en el análisis de discriminación lineal LEfSe .....	54
9.6	Comparación de comunidades entre inmunoglobulinas.....	56
9.7	Análisis de la asociación de diversidad de la microbiota con las rutas metabólicas en muestras de calostro por PICRUST .....	57
9.8	Composición de la microbiota en muestras de copro de Neonatos y en fracciones bacterianas unidas a inmunoglobulinas.....	59
9.9	Diversidad bacteriana en muestras de copro de neonatos alimentados con lactancia Materna Exclusiva. ....	60
9.10	Principales taxones prevalentes en muestras de copro de neonatos .....	62
9.11	Relación de bacterias provenientes de calostro y la microbiota fecal de neonatos .....	64



9.12	Correlación entre tiempo posparto con la abundancia de bacterias y el aporte bacteriano por inmunoglobulinas .....	66
10	DISCUSION .....	68
11	CONCLUSIÓN .....	79
12	PERSPECTIVAS.....	79
13	BIBLIOGRAFÍA .....	80
14	ANEXOS .....	90
14.1	Tabla S1 Taxones diferenciales unidos a Inmunoglobulinas en Copro de neonatos .....	90
14.2	Aprobación de protocolo de investigación.....	93
14.3	Consentimiento Informado .....	94
14.4	Cuestionario de Metadatos Aplicado.....	97
14.5	Análisis de Datos de Citometría de Flujo .....	99
14.6	Productos de PCR para genotecas V3 rDNA 16S .....	101
14.7	Controles de citometría de Flujo .....	103

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Generalidades de las Inmunoglobulinas más abundantes en Humanos. .....	18
<b>Tabla 2.</b> Principales estudios de bacterias recubiertas con inmunoglobulinas	29
<b>Tabla 3.</b> Iniciadores y mezcla de reacción para la amplificación de la región V3. .....	44
<b>Tabla 4.</b> Condiciones para la amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA..	44
<b>Tabla 5.</b> Características sociodemográficas y clínicas de la Población.....	48
<b>Tabla 6.</b> Datos de separación por FACS en muestras de Calostro .....	50
<b>Tabla 7.</b> Datos de separación por FACS en muestras de Copro de neonatos	50

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Clasificación taxonómica del “core” microbiota en la leche materna..	14
<b>Figura 2.</b> Principales fuentes bacterianas de la leche materna. ....	15
<b>Figura 3.</b> Diagrama de estructura de las inmunoglobulinas más abundantes ..	17
<b>Figura 4.</b> Secreción de Inmunoglobulinas en leche materna.....	19
<b>Figura 5.</b> Roles de inmunoglobulinas en la regulación de la microbiota en intestino.....	21
<b>Figura 6.</b> Factores que influyen la microbiota del infante.....	24
<b>Figura 7.</b> Esquema general de metodología Empleada.....	36
<b>Figura 8.</b> Separación de bacterias por perlas magnéticas (MACS). ....	41
<b>Figura 9.</b> Esquema del gen 16S rDNA bacteriano. ....	43
<b>Figura 10.</b> Análisis representativo de citometría de Flujo de las fracciones obtenidas por FACS en Calostro.....	49
<b>Figura 11.</b> Abundancia relativa de bacterias unidas a inmunoglobulinas en calostro.....	52
<b>Figura 12.</b> Diversidad alfa de la microbiota de calostro asociada a inmunoglobulinas maternas.. ....	53
<b>Figura 13.</b> Diversidad Beta en bacterias positivas a inmunoglobulinas maternas en calostro. ....	54

<b>Figura 14.</b>	Comparación LEfSe (Linear discriminant analysis effect size) entre taxones bacterianos de fracciones bacterianas asociadas con los isotipos IgA2 e IgM en muestras de calostro. ....	55
<b>Figura 15.</b>	Diferencias entre comunidades bacterianas unidas a IgA2 e IgG.	56
<b>Figura 16.</b>	Análisis funcional de metagenoma predictivo PICRUST2. ....	58
<b>Figura 17.</b>	Abundancia relativa en fracciones de bacterias de copro unidas a inmunoglobulinas.. ....	60
<b>Figura 18.</b>	Diversidad bacteriana en fracciones de copro de neonato. ....	61
<b>Figura 19.</b>	Diversidad Beta de las comunidades bacterianas en copro de neonatos.....	62
<b>Figura 20.</b>	Análisis LefSe entre bacterias IgG+, bacterias IgM+ e IgA2+ en muestras de copro de neonatos.....	63
<b>Figura 21.</b>	Metagenoma predictivo en muestras de copro de neonatos por análisis PICRUST2.. ....	64
<b>Figura 22.</b>	Análisis de fuentes bacterianas en el intestino neonatal por Source tracking.	65
<b>Figura 23.</b>	Correlación del tiempo después del parto con bacterias y sus fuentes.....	66

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Composición de la leche materna

La leche materna (LM) es el primer alimento que ingiere un recién nacido. Es la fuente normativa (recomendada por la OMS y UNICEF) de nutrición óptima para lactantes en los primeros seis meses de vida para lograr un crecimiento y desarrollo óptimos (Duale *et al.*, 2022a).

La composición de leche materna es distinta a lo largo del tiempo, adaptándose a las demandas energéticas y fisiológicas del recién nacido en crecimiento. De acuerdo con las etapas de lactancia, la primera secreción producida en los primeros 2-4 días después del parto es el calostro, el cual contiene factores que contribuyen mayormente a la defensa y estimulación inmune del recién nacido más que a su nutrición (Ballard & Morrow, 2013). El calostro es también una fuente esencial de microorganismos para la primera microbiota del recién nacido (E. Sánchez-Salguero *et al.*, 2021). En la glándula mamaria, se producen bajos volúmenes de calostro que contienen altos niveles de proteína, minerales y bajos niveles de carbohidratos y grasa en comparación con la leche materna madura (Rio-aige *et al.*, 2021; Ruiz *et al.*, 2019).

En términos de composición, el calostro contiene como principal carbohidrato lactosa, la cual aporta más del 40% de la energía del infante. Otros componentes importantes son los oligosacáridos (HMOs), un grupo complejo y diverso de glicanos considerados el tercer elemento más abundante del calostro, con más de 200 estructuras distintas (Ogra *et al.*, 2020). La leche también contiene otros macronutrientes importantes como los ácidos grasos que, no solo proveen energía, sino que actúan como reguladores importantes de funciones inmunes y metabólicas (Ramiro-Cortijo *et al.*, 2020).

El calostro también es rico en componentes bioactivos e inmunes como: inmunoglobulinas (Igs), lactoferrina, leucocitos, oligosacáridos, péptidos antimicrobianos y bacteriocinas. Adicionalmente contiene componentes antiinflamatorios, miRNAs, hormonas y otras sustancias implicadas en las

interacciones microorganismo-hospedero. Las concentraciones de estas sustancias varían entre individuos, dentro de un día y entre tomas; también están determinadas por la dieta, el genotipo materno, la edad gestacional, el estado de salud materno y el entorno que rodea a la madre (Duale *et al.*, 2022b) (Selma-Royo *et al.*, 2022).

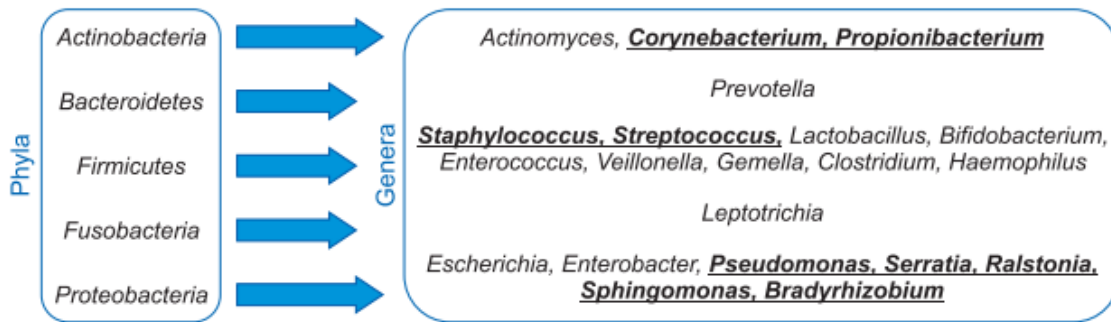
El calostro tiene un papel clave en la salud infantil al educar el sistema inmune, conferir protección contra patógenos, proteger al recién nacido frente a infecciones y contribuir al estrechamiento del vínculo madre-hijo, favoreciendo un adecuado desarrollo psicomotor. Se ha observado también una disminución en la prevalencia de diferentes enfermedades como: infección respiratoria baja, enterocolitis necrotizante, infección urinaria, meningitis, síndrome de muerte súbita, etc. En edad adulta evita el padecimiento de otras enfermedades como: diabetes tipo 1 y 2, dermatitis atópica, asma, obesidad, leucemia, linfoma, enfermedad celíaca, hipertensión arterial y arterioesclerosis (Fernández *et al.*, 2013; Gomez-Gallego *et al.*, 2016; Morrow *et al.*, 2004; Rio-aige *et al.*, 2021; Selma-Royo *et al.*, 2022).

## **1.2 Microbiota de la leche materna**

Uno de los componentes más importantes del calostro, es la microbiota, un conjunto de bacterias únicas, mutualistas y comensales, las cuales juegan diferentes papeles en infante. En este trabajo definimos “comensales” como las bacterias que, en condiciones de homeostasis no ocasionan un daño al hospedero.

Existen trabajos donde se han identificado diferentes bacterias por métodos de cultivo tales como: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium spp.*, *propionibacterium* etc. De la misma manera un gran grupo de bacterias se han identificado por técnicas moleculares como la secuenciación masiva, tales como: *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Kaistobacter*, *Clostridium* etc. (Figura1) (Cabrera-Rubio *et al.*, 2016; Hunt *et al.*, 2012; Jost *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2007).

Asimismo, en estudios realizados en mujeres sanas, la diversidad de la microbiota caracterizada en la leche humana fue: *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Sphingomonas* y *Enterococcus spp.* (Osorio & Umbarila, 2015) (Notarbartolo *et al.*, 2022).



**Figura 1.** Clasificación taxonómica del “core” microbiota en la leche materna. Tomado de (Notarbartolo *et al.*, 2022).

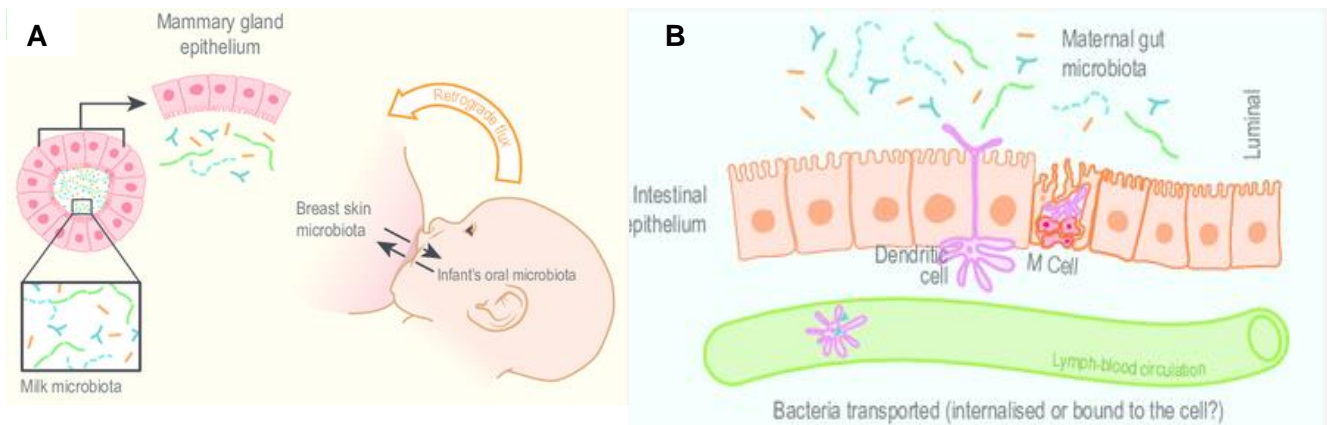
Parte de la función de estas bacterias es contribuir al desarrollo del microbioma intestinal infantil, fomentando el desarrollo de la propia microbiota intestinal neonatal. Aunque durante todo el periodo de lactancia, la madre proporciona bacterias al infante, solo un subconjunto de las bacterias de la leche materna reside en el intestino del bebé. (Clemente *et al.*, 2012; Fitzstevens *et al.*, 2017; Gomez-Gallego *et al.*, 2016). Estas bacterias que se establecen en el intestino infantil juegan diferentes roles en el intestino infantil como:

- Reducción de la incidencia y la gravedad de las infecciones en el lactante. Esto debido a diferentes mecanismos como: exclusión competitiva, la producción de compuestos antimicrobianos, o la mejora de la función de la barrera intestinal al aumentar la producción de mucina y reduciendo la permeabilidad intestinal.
- Estimulación temprana del sistema inmunológico mediante patrones antigénicos bacterianos
- Contribución a la digestión infantil, a través de la descomposición de azúcares y proteínas, desarrollan un notable potencial para desempeñar papeles metabólicos en el lactante y reduce la incidencia y la gravedad de la respuesta alérgica (Fernández *et al.*, 2013).

La fuente de estas bacterias en la leche humana ha sido ampliamente discutida. Existen 2 teorías: la ruta del flujo retrógrado, que consiste en que bacterias que se encuentran en la cavidad oral del neonato penetran en los ductos lactíferos de la madre contribuyendo a la colonización de ese entorno (Figura 2A).

Por otra parte, la vía entero-mamaria bacteriana sugiere que la microbiota intestinal materna es capturada por células dendríticas (DC), que pueden penetrar en el epitelio intestinal (Jost *et al.*, 2014; Rescigno *et al.*, 2001). Estas células penetran a través de las uniones estrechas epiteliales para acceder a los ganglios linfáticos mesentéricos de las placas de Peyer y circular dentro del sistema linfoide asociado a mucosas. Posteriormente estas células se trasladan al epitelio mamario donde son transferidas al intestino neonatal tras consumo de leche humana, y una vez en el intestino, colonizan dicho nicho (Figura 2B) (Fernández *et al.*, 2013; Jost *et al.*, 2015; Perez *et al.*, 2007).

Además, se sabe que, durante el período de lactancia, la colonización de la glándula mamaria por las células del sistema inmune es un proceso selectivo por las hormonas lactogénicas (Fernández *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Principales fuentes bacterianas de la leche materna. A) Flujo retrógrado B) vía entero-mamaria. Tomado de (Jeurink *et al.*, 2012).

### 1.3 Interacción microbiota- hospedero

Debido a la gran cantidad de microorganismos que habitan el cuerpo humano, el hospedero ha desarrollado una red sofisticada de células y moléculas que sirven para mantener la homeostasis de las superficies mucosas y para establecer una relación simbiótica entre el huésped y el hospedero. Tal relación ha sido establecida a través del sistema inmune asociado a mucosas, conocido como el tejido linfoide asociado a las mucosas, es cual es capaz de proteger al cuerpo contra potenciales patógenos y, al mismo tiempo, establecer mecanismos de

tolerancia frente a los microorganismos comensales (Belkaid & Harrison, 2017; E. S. Sánchez-Salguero & Santos-Argumedo, 2018).

Los sitios donde los microorganismos residen en el hospedero son los epitelios de mucosas, los cuales son tejidos que se caracterizan por una lámina propia formada por un tejido conectivo laxo subyacente. La lámina propia brinda sostén a la membrana basal, la cual a su vez se une con una monocapa de células epiteliales polarizadas de tipo columnar estratificado no queratinizado. Estas células epiteliales se unen entre sí mediante uniones estrechas y representan la primera barrera física del cuerpo contra los microorganismos (E. S. Sánchez-Salguero & Santos-Argumedo, 2018).

La capacidad total de reconocimiento del sistema inmunológico está dada por un gran número de mecanismos específicos mediados por células y moléculas, sin embargo uno de los factores más importantes en respuesta a los microorganismos residentes y el mantenimiento de la homeostasis en los epitelios es a través de la respuesta inmune humoral llevada a cabo a través de las inmunoglobulinas que son un factor clave en el mantenimiento de la relación de homeostasis (Fujihashi *et al.*, 2012; E. S. Sánchez-Salguero & Santos-Argumedo, 2018).

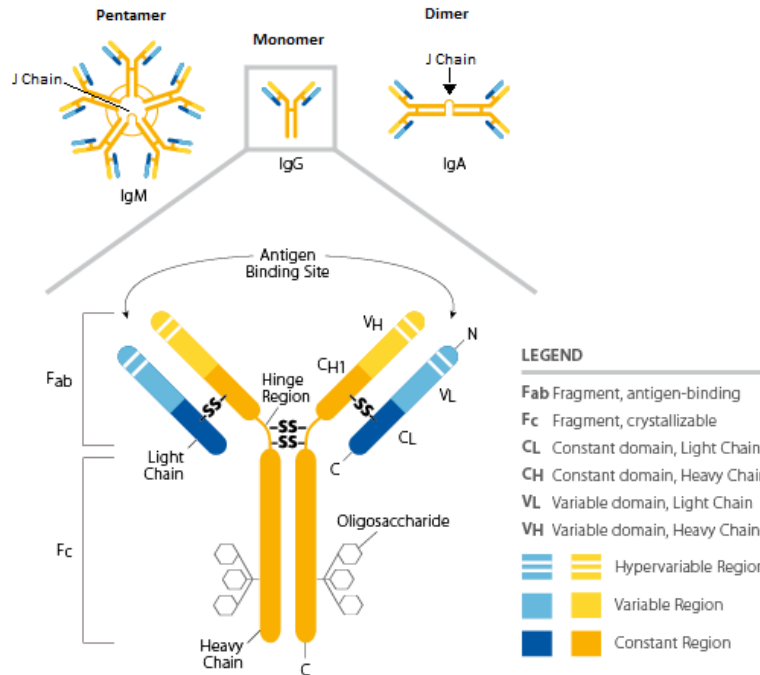
#### **1.4 Inmunoglobulinas maternas**

Las inmunoglobulinas o también conocidas por su función como: “anticuerpos” forman un componente importante de la actividad inmunológica. Son fundamentales para el vínculo inmunológico que ocurre cuando la madre transfiere inmunidad pasiva a la descendencia (Hurley & Theil, 2011).

Las inmunoglobulinas son complejos heteroméricos compuestas de dos cadenas pesadas idénticas (~ 55 kD) y dos cadenas ligeras idénticas (~ 25 kD), con una masa molecular total de aproximadamente 160 kilodaltons. Las cadenas ligeras interactúan con el extremo amino de las cadenas pesadas para formar el dominio F(ab) de la molécula que contiene los sitios de unión a antígeno en sus puntas. La porción carboxilo de las cadenas pesadas se combina para formar el dominio Fc, que permite interacciones con el complemento y los receptores Fc. Las cadenas pesadas y ligeras están unidas por enlaces disulfuro, lo que da como resultado la



clásica forma de “Y” de la molécula de inmunoglobulina (Hurley & Theil, 2011). De la misma manera algunas inmunoglobulinas poseen la cadena J (~ 15 kDa) que une las cadenas pesadas para formar inmunoglobulinas poliméricas (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama de estructura de las inmunoglobulinas más abundantes (Scientific, 2022)

Las diferencias en los polipéptidos de la cadena pesada permiten que estas inmunoglobulinas funcionen en diferentes tipos de respuesta inmune y en etapas en particular. Las secuencias de proteínas del polipéptido responsables de estas diferencias se encuentran principalmente en el fragmento Fc. Si bien hay cinco tipos diferentes de cadenas pesadas, solo hay dos tipos principales de cadenas ligeras: kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ) (Hurley & Theil, 2013). Existen cinco isotipos de anticuerpos conocidos (IgA, IgM, IgG, IgE e IgD), de entre ellos los más abundantes son los primeros 3 los cuales se encuentran en leche materna. Estos anticuerpos varían en cuanto su cantidad, el sitio de acción, mecanismos y especificidad, sus cualidades generales se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Generalidades de las Inmunoglobulinas más abundantes en Humanos.

<b>Propiedades</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>	<b>IgA</b>
Peso molecular	150,000	900,000	320,000 (secretora)
Tipo de cadena H	gamma	mu	alfa
Concentración en calostro* (mg/mL)	1.509 ± 0.82	2.64	24.76
% inmunoglobulina total	75%	10%	15%
Glicosilación (en peso):	3%	12%	10%
Distribución	Intra/extravascular	mayoritariamente intravascular	intravascular y secreciones
Función	Respuesta a patógenos	Homeostasis y unión a patógenos	proteger las membranas mucosas y establecimiento de comensales
Formas	Monómeros	Monómeros, Pentámero	Monómeros, dímeros
Receptor en mucosas	FcRn	pIgR	pIgR

Ref. (Scientific, 2022); Kubinak and Round 2016).\* (E. Sánchez-Salguero *et al.*, 2019)

En mucosas maternas especialmente en el intestino en condiciones normales, hay una producción constante de inmunoglobulinas, en especial de IgA que es la inmunoglobulina con mayor abundancia en mucosas comparada con otras inmunoglobulinas (IgM, IgG). Estas inmunoglobulinas mantienen la homeostasis y el reconocimiento a bacterias habitantes del intestino (Ding *et al.*, 2021).

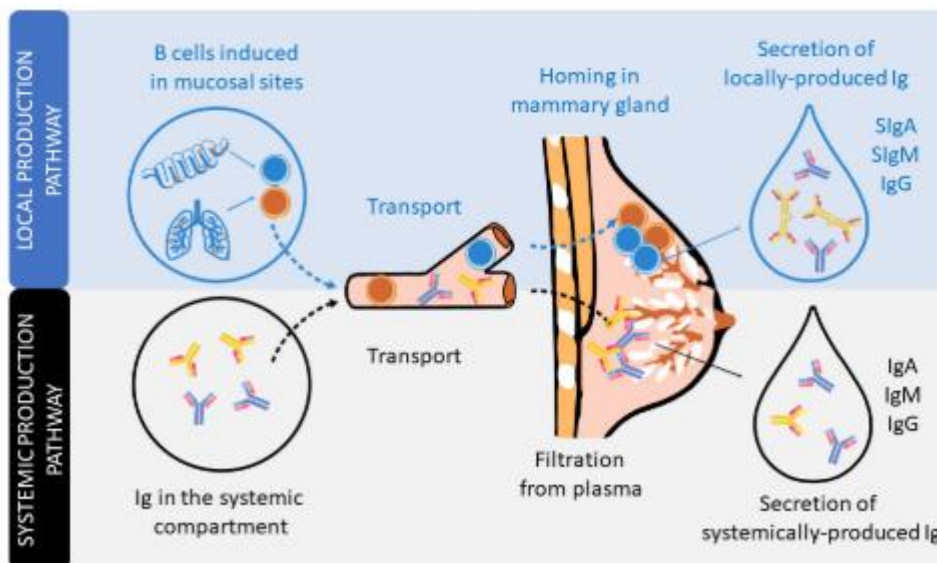
En la superficie de mucosas, ocurre un constante muestreo, procesamiento y estimulación de células T y B con bacterias residentes del intestino; dicho proceso favorece la producción y secreción de inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas son producidas mediante 2 mecanismos distintos: vía T dependiente (partición de células T) o mediante mecanismos independientes de células T (León & Francino, 2022; Pabst & Slack, 2020).

Trabajos recientes demostraron que el reconocimiento de miembros de la microbiota por inmunoglobulinas se da principalmente mediante vías T independientes, que tienen un proceso de maduración de afinidad, en este caso la maduración de afinidad toma lugar en centros germinales localizados en estructuras linfoides como placas de Peyer en GALT (León & Francino, 2022)

### 1.5 Secreción de Inmunoglobulinas en leche materna e Intestino

Las inmunoglobulinas en la leche materna son producidas por células plasmáticas que se acumulan en la glándula mamaria. Se ha visto que células plasmáticas productoras de IgA, previamente estimuladas en placas de Peyer y nódulos linfáticos, expresan CCR10 y migran por quimiotaxis a las glándulas mamarias donde las células epiteliales tejido mamario expresan CCL28 durante la lactancia (Athey & Alter, 2021) (Figura 4).

Una vez en la glándula mamaria, las células plasmáticas producen las inmunoglobulinas. La IgM e IgA se unen al receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR) que se expresa en la superficie basolateral del epitelio mamario, y son transportadas a través del epitelio a la superficie apical (Chen *et al.*, 2020). La escisión proteolítica de la porción unida al anticuerpo de pIgR, conocida como el componente secretor (SC) da como resultado la liberación de IgA e IgM secretoras (SIgA e SIgM). La secreción de IgG proveniente de sangre también puede ser transferida a la leche por un transportador diferente conocido como el receptor Fc neonatal (FcRn) expresado en las células epiteliales de la glándula mamaria (Yoshida & Wayne I. Lencer, 2006).



**Figura 4.** Secreción de Inmunoglobulinas en leche materna. Las células plasmáticas y los anticuerpos viajan a la glándula mamaria y son secretados o localmente producidos. Tomado de (Rio-aige *et al.*, 2021).

## **1.6 Tipos de unión de las inmunoglobulinas a microbiota**

Las interacciones de SIgA pueden llevarse de 2 maneras: canónica y no canónica. La primera describe la unión del antígeno a través de la región F(ab) del anticuerpo, siendo la especificidad de unión determinada mayormente por regiones de complementariedad (CDR3). Mientras que las no canónicas excluyen las interacciones F(ab) y describen todas las demás modalidades de unión, incluyendo las uniones a través de las glicosilaciones del anticuerpo, así como la unión a través del componente secretor. Las SIgA son anticuerpos altamente glicosilados con diferentes tipos de residuos de glicanos, lo cual facilita este tipo de uniones (León & Francino, 2022; Pabst & Slack, 2020). Se ha documentado que la unión de SIgA a la microbiota puede llevarse de ambas formas, predominando las interacciones canónicas (Sterlin *et al.*, 2020). La SIgA es una inmunoglobulina dimérica, por lo que los antígenos repetidos pueden unirse por más de una región F(ab), incrementando la avidéz. Así mismo los anticuerpos que unen a la microbiota suelen presentar propiedades de poli reactividad, el cual describe que un anticuerpo puede reaccionar a una variedad de antígenos estructuralmente no relacionados como lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares, flagelina, regiones CpG y otros antígenos. Por lo tanto, suele ocurrir la reactividad cruzada entre especies no relacionadas. Estos mecanismos no están claramente descritos aún (Bunker & Bendelac, 2018; Pabst & Slack, 2020).

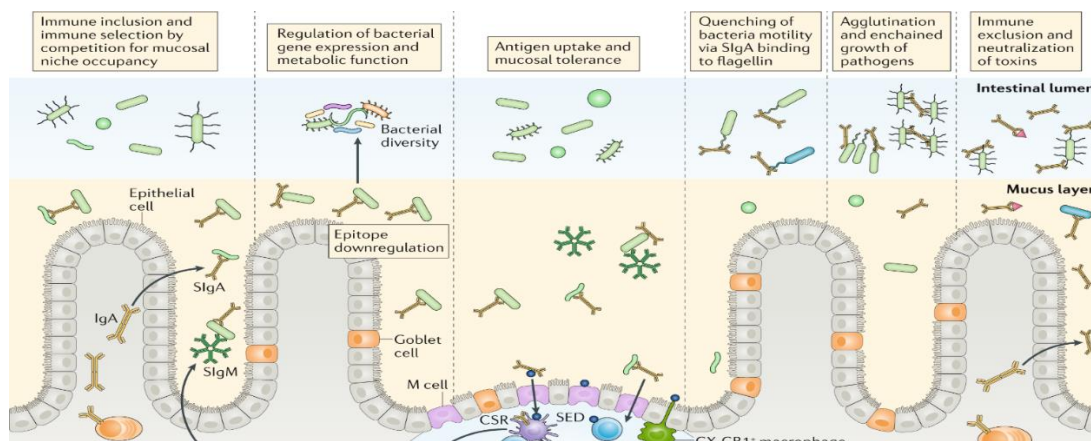
Una hipótesis sobre la reactividad cruzada en los anticuerpos que unen microbiota es que, debido al gran número de especies que habitan en el tracto gastrointestinal, es extremadamente costoso para el sistema inmune generar IgA para cada bacteria; por lo que resultaría más eficiente reaccionar a más de una especie. Se ha observado que un solo anticuerpo monoclonal es capaz de unir varias especies de la microbiota (Bunker *et al.*, 2017; Sterlin *et al.*, 2020).

## **1.7 Mecanismos de respuesta por inmunoglobulinas a la microbiota**

Se ha observado que, en humanos sanos sin afecciones inflamatorias crónicas, se pueden encontrar anticuerpos reactivos a la microbiota. Los anticuerpos desempeñan un papel crucial en la protección del huésped contra infecciones mediante mecanismos de exclusión, tales como: la unión de epítomos

de superficie para bloquear la unión de microorganismos al huésped, la aglutinación de células microbianas, la promoción de fagocitosis por parte de las células inmunes innatas mediante opsonización de bacterias, la neutralización de toxinas microbianas u otras sustancias secretadas por bacterias y la presentación de antígenos por las células dendríticas en la lámina propia (Kubinak & Round, 2016). La presencia de anticuerpos reactivos con microbiota intestinal en la periferia de individuos sanos sugiere que el huésped está preparado para responder a los organismos que pueden escapar del tracto gastrointestinal (Soto & Round, 2016) (Figura 5).

Aunque las funciones más conocidas de los anticuerpos son de exclusión inmunológica, también existen funciones de inclusión inmunológica. Algunas de estas funciones son: ayudar a establecer microorganismos dentro de la mucosa intestinal, regular expresión bacteriana de genes con funciones metabólicas, y contribuir a la tolerancia de bacterias mediante el correcto muestreo de estas (Chen, *et al.*2020) (Figura 5).



**Figura 5.** Roles de inmunoglobulinas en la regulación de la microbiota en intestino. Tomado de (Chen *et al.*, 2020).

La inmunoglobulina A (SIgA), es el elemento principal de la homeostasis intestinal, promueve interacciones simbióticas huésped-microbiota en el intestino delgado y en menor medida, el intestino grueso (Bunker & Bendelac, 2018). La IgA no activa el complemento u otras funciones efectoras inflamatorias, pero se cree que ejercen su acción aglutinando las bacterias y bloqueando su interacción con las

células epiteliales de la mucosa. Adicionalmente a estos mecanismos, se ha observado que la SIgA contribuye en la colonización intestinal al promover la adhesión de bacterias a la capa de mucus que recubre el epitelio intestinal (Magri *et al.*, 2017). Algunas otras funciones de la SIgA, se encuentra su contribución en la formación de biofilm a través de 2 mecanismos no exclusivos: sirviendo como andamio para bacterias o anclando las bacterias al epitelio (León & Francino, 2022). Aunque las respuestas de IgA han sido el foco principal de la investigación en inmuno-selección mediada por anticuerpos en el intestino, otras clases de anticuerpos también pueden influir en este proceso. (Yoshida *et al.*, 2004; Kubinak *et al.*, 2016)

La inmunoglobulina M (IgM) es uno de los primeros anticuerpos generados en respuesta a un antígeno dado. Su afinidad y especificidad es baja en comparación con los otros isotipos. La producción de SIgM (IgM secretora) aumenta con la inducción de daño colónico para evitar la diseminación letal de los comensales (Kirkland *et al.*, 2012). Aunque es menos abundante que SIgA, la SIgM provee de protección en las mucosas en los primeros días antes de la producción dominante de IgA; así mismo, rescata parcialmente la deficiencia de IgA ya que une eficientemente blancos de IgA en el lumen intestinal (MacPherson *et al.*, 2007). Aunque es eficiente en el lumen, actúa predominante en el mucus donde coopera con SIgA, siendo secretada por células B de memoria (MBCs-M). Se ha reportado que, en homeostasis, es dirigida a comensales incrustados en moco del íleon; esto contribuye a brindar protección contra diversas bacterias. La SIgM une a bacterias que son blanco de SIgA, pero a su vez también enriquece el repertorio de bacterias unidas en el intestino (Fadlallah *et al.*, 2018; Magri *et al.*, 2017).

Otras inmunoglobulinas como la IgG también participan en la homeostasis intestinal. Zeng y colaboradores demostraron que, la IgG sérica producida por la inducción de miembros específicos de la microbiota, pueden proteger activamente al huésped de infecciones sistémicas producidas por patógenos, debido a la expresión de epítomos compartidos (Soto & Round, 2016; Zeng *et al.*, 2017). En general IgG mejora la homeostasis en mucosas controlando bacterias invasivas y no invasivas de las mucosas, ejerciendo funciones homeostáticas y de defensa en

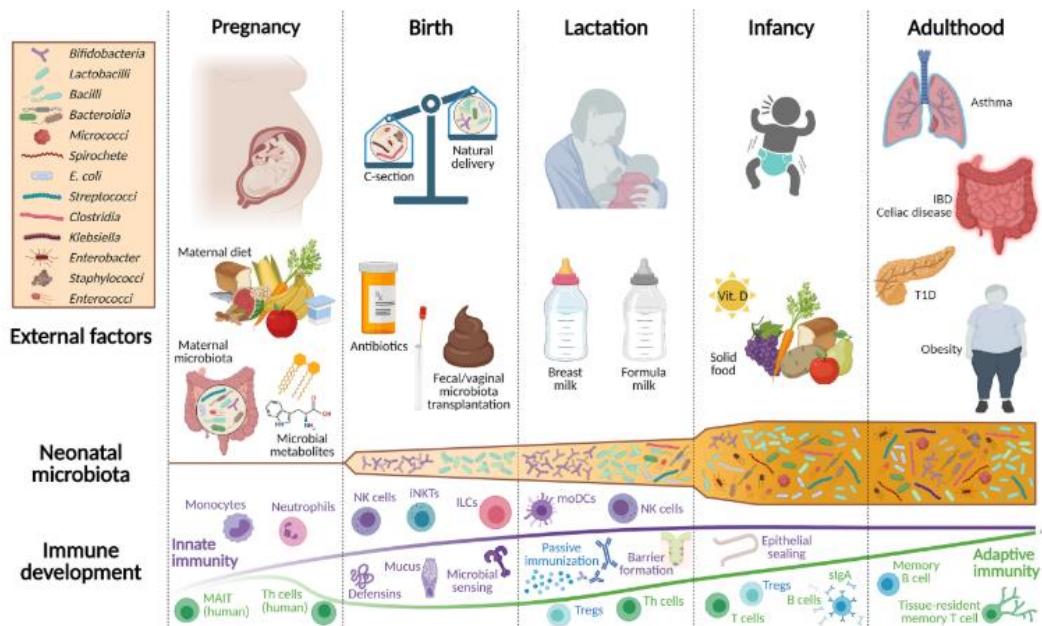
cooperación con la SIgA y la SIgM (Chen *et al.*, 2020). La IgG es crítica para las mucosas de los neonatos, ya que ayuda a la adaptación de la colonización por comensales y la defensa contra patógenos. La IgG derivada de leche materna puede promover maduración intestinal, y la tolerancia a comensales. Así mismo, esta inmunoglobulina es capaz de muestrear antígenos lumenales para su presentación antigénica a las células en la capa subepitelial (Koch *et al.*, 2016).

### **1.8 Microbiota del neonato en los primeros días**

La colonización del intestino infantil representa el ensamblaje *de novo* de una comunidad microbiana, este proceso no es azaroso, si no que, sigue un gradiente temporal de incremento de diversidad. Dicho proceso está influenciado por varios factores ambientales y del huésped (Chassard *et al.*, 2014) .

Hasta hace poco tiempo se pensaba que este proceso de colonización comenzaba con el nacimiento, sin embargo, algunos autores proporcionan evidencia creciente de que la colonización comienza en el útero (Milani *et al.*, 2017). No obstante, existen otros factores que afectan la microbiota del infante desde los primeros momentos de vida como: tipo de parto, uso de antibióticos, edad gestacional, edad materna, y sobre todo la alimentación del neonato (Kalbermatter *et al.*, 2021).

Después del nacimiento, el sistema inmune debe adaptarse a una serie de cambios y al ambiente; además de responder adecuadamente a la colonización intestinal por especies microbianas complejas. Esta microbiota inmadura compuesta principalmente por bacterias cuya fuente es la madre (leche, la piel materna y el canal vaginal) se establece a través de diversos mecanismos que promueven la homeostasis intestinal a lo largo de la vida (Laursen *et al.*, 2021) (Figura 6).



**Figura 6.** Factores que influyen en la microbiota del niño. Tomado de Kalbermatter, 2021

El microbioma intestinal de los bebés alimentados exclusivamente con leche materna es drásticamente distinto del de los bebés alimentados con fórmula de la misma edad. El microbioma intestinal neonatal inicial en los recién nacidos sanos a término se caracteriza por la presencia de Proteobacteria y Actinobacteria cuyos miembros se caracterizan por ser aerobios o anaerobios facultativos como: *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, Clostridia, *Lactobacillus* y miembros de la familia Enterobacteriaceae que actúan como pioneros en los primeros días; estos se establecen debido a la baja abundancia de oxígeno. *Pseudomonas* y *Acinetobacter* pueden transitoriamente colonizar a los recién nacidos durante las primeras semanas de vida (Adlerberth & Wold, 2009; Zhuang *et al.*, 2019).

A estas bacterias, en especial a los bebés alimentados con leche materna, pronto siguen los anaerobios y, en particular, los miembros de los géneros *Bifidobacterium* y *Bacteroides* (Rautava, 2020). Esto debido a otros componentes en la leche materna que sirven como prebióticos y son consumidos por la microbiota inicial. (Chassard *et al.*, 2014). En cambio, bebés que fueron alimentados con fórmula son dominados por Clostridia, Staphylococci, Enterobacteria, Enterococci y *Atopobium* (Tamburini *et al.*, 2016).



## 1.9 Adaptación del neonato a la colonización y el papel de la leche materna

El sistema inmune se encuentra en un proceso de constante adaptación al ingreso de bacterias al tracto digestivo del lactante. Estos microorganismos no son totalmente destruidos, dado que deben ser reconocidos como organismos que contribuyen a una relación mutualista. Aunque estas interacciones inician a edad temprana, se mantienen a lo largo de la vida. Por ejemplo: Se ha descrito que, desde el primer día de vida, receptores tipo Toll (TLR1 o TLR9) está adaptado para reconocer patrones microbianos (PAMs), principalmente estructuras microbianas específicas como LPS (Barton & Medzhitov, 2003; Kalbermatter *et al.*, 2021). Posteriormente, a lo largo de la vida del infante, la microbiota intestinal va modificándose debido a las interacciones entre bacterias, la competencia y segregación de moléculas. El sistema inmune juega un papel importante en este proceso mediante la selección de grupos bacterianos (Milani *et al.*, 2017) .

La leche materna proporciona la primera fuente de protección inmune antígeno-específica en el tracto gastrointestinal de los mamíferos lactantes, además ejerce una fuerte acción inmunomoduladora y es una fuente próspera de bacterias colonizadoras (Kalbermatter *et al.*, 2021). La leche materna contiene un amplio repertorio de elementos de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa. Varios componentes de la leche humana ejercen una acción moduladora del sistema inmune. Por ejemplo, el CD14 soluble, (un receptor de lipopolisacáridos), regula las respuestas inmunes innatas contra las bacterias Gramnegativas. Además, existe evidencia de una relación inversa entre el CD14 de la leche materna y el riesgo de desarrollar una enfermedad atópica (Baldassarre *et al.*, 2014; Rautava *et al.*, 2012).

Las células inmunes maternas, citocinas, receptores de citocinas y factores de crecimiento contenidos en la leche humana modulan la respuesta inmune, así como la maduración intestinal en el bebé. Un ejemplo de estas moléculas es el TGF- $\beta$ , el cual juega un papel fundamental en la tolerancia inmune inducida por la LM a antígenos de la dieta y microorganismos intestinales endémicos mediante la inducción de células T reg (Verhasselt, 2010). El TGF- $\beta$  restringe la respuesta

inflamatoria mediante la inhibición de células proinflamatorias y promoviendo la función de las células Treg (Wan & Flavell, 2007).. Del mismo modo el TGF- $\beta$  y la IL-10 en LM limitan la traslocación bacteriana a tejidos subyacentes y promueven respuestas tolerogénicas hacia la microbiota (Koch *et al.*, 2016) También hay evidencia de que el TGF- $\beta$  influye en la maduración inmune en el intestino humano (Baldassarre *et al.*, 2014; Rautava *et al.*, 2012).

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG y su relación con la microbiota

Existen estudios enfocados a la relación de la respuesta inmune humoral y la microbiota, en ellos se muestran diferentes isotipos de inmunoglobulinas que son capaces de marcar o unirse a bacterias comensales de la microbiota. La mayoría de los estudios están enfocados a principalmente a la microbiota intestinal unida a la IgA, esto debido a su alta abundancia en mucosas. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por D' Auria y colaboradores, donde en voluntarios sanos analizaron la microbiota intestinal recubierta con IgA y al mismo tiempo, evaluar la viabilidad en estas bacterias. Encontrando bacterias viables predominantemente proteobacteria: *Sphingobacteria*, *Pseudomonas*, y *Burkholderiales* (D'Auria *et al.*, 2013). Otros trabajos realizados en ratones apoyan estos resultados ya que, de igual forma, la IgA recubrió proteobacterias en particular de la familia Enterobacteriaceae (Mirpuri *et al.*, 2013).

También existen otros trabajos importantes como el de Van der waii y colaboradores los cuales exploraron la unión de bacterias anaerobias presentes en heces humanas a distintos isotipos de inmunoglobulinas. En este trabajo mostraron que la mitad de las bacterias anaerobias están recubiertas con IgA (24-74%), mientras que una cantidad considerablemente menor están recubiertas con IgG (25%), IgM (11%) o no están recubiertas en absoluto (Van Der Waaij *et al.*, 1996).

Posteriormente surgen trabajos donde exploran cual es el papel de los isotipos de Inmunoglobulinas M y G, que, a pesar de que no son las más abundantes en mucosas, juegan papeles importantes en la regulación de la homeostasis. Entre esos trabajos se encuentra el de Koch y colaboradores, quienes en 2016 reportaron la unión a microbiota en ratones jóvenes por parte de inmunoglobulinas no solo del tipo IgA, sino también de IgG2b e IgG3 producidos por la vía T independiente. Dicho estudio, resalta la importancia estos anticuerpos maternos para educar al sistema inmune neonatal con comensales recién adquiridos.(Koch *et al.*, 2016)

La IgG que reconoce microbiota también puede reconocer patógenos, evitando que estos se fijen en el intestino y eliminándolos de una manera limpia, evitando mecanismos de inflamación que puedan dañar al hospedero. (Eckmann & Stappenbeck, 2015; Yoshida & Wayne I. Lencer, 2006; Zeng *et al.*, 2017).

En el caso de IgM, Magri describe que en el intestino humano existe un gran repertorio de SIgM contra comensales incrustados en el mucus intestinal, estos comensales también suelen ser blanco de sIgA (Magri *et al.*, 2017). Por último, entre los estudios más recientes y mayormente relacionados a este trabajo, se encuentra el realizado por Meyer (Meyer *et al.*, 2018). Este estudio describe la unión IgA materna a bacterias en intestino de la madre, en la leche materna y por último en el intestino del neonato; encontrando fracciones de IgA unida a distintos taxones no patogénicos como *Bifidobacterium spp.* Los resultados de este trabajo sugieren, que las bacterias unidas a IgA pueden transferirse de la madre al bebé a través de la leche materna, potencialmente como un mecanismo para modular el establecimiento del microbioma intestinal y el sistema inmunitario del bebé en desarrollo. Estos y otros ejemplos de trabajos estudiados en relación a la microbiota se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Principales estudios de bacterias recubiertas con inmunoglobulinas

Inmunoglobulina	Tipo de muestra	Principales bacterias reportadas	Resultado principal	Método de análisis	Función o mecanismo	Referencia
IgA	Muestras fecales de Ratón y humano. Muestras de Jejunio	Intestino Delgado: S24-7, <i>Lactobacillus</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Phylobacteriaceae</i> , <i>Musci</i> <i>spirillum</i>	-IgA una predominante bacterias del intestino delgado	MACS	Contribución a la homeostasis intestinal regulación comensales como motilidad y expresión de genes.	(Bunker <i>et al.</i> , 2015)
		Colon: Clostridiales, <i>Ruminococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , Rickenellaceae	-Comensales son recubiertos por IgA TI, pero pequeño grupo de bacterias evade este recubrimiento e induce respuestas T dependientes.			
		Colon humano: <i>Suterella</i> , <i>Akkermansia</i> , Enterobacteriaceae	-20% de las bacterias de colon son bacterias IgA+.			
IgA1 e IgA2	Muestras fecales humanas Muestras de íleon	<b>IgA2</b> <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Butyrivibrio</i> , <i>Achromobacter</i> IgA1 <i>Serratia</i> , <i>Rhodococcus</i>	-La Mayoría de los comensales son doblemente recubiertos por IgA1 e IgA2 en el intestino delgado -IgA2 recubre mayormente comensales en las heces de donadores y predomina en los primeros días -IgM una bacterias IgA1 e IgA2+.	FACS	Recubrimiento de comensales, localiza bacterias en un hábitad favorable.	(Sterlin <i>et al.</i> , 2020)

<b>IgA1 e IgA2</b>	Calostro humano Copro de neonato	IgA2: <i>Bifidobacterium, Pseudomonas, Lactobacillus, Paracoccus, Sphingomonas, Phyllobacteria</i>  IgA1: <i>Staphylococcus Streptococcus y Clostridium</i>	IgA2 microbiota es compartida entre calostro y muestras fecales de recién nacidos. IgA2 muestra perfiles metabólicos que controla microbiota tardía.	MACS	Auxiliar en la colonización del intestine - promueve respuestas tolerogénicas contra colonizadores y su control.  (E. Sánchez-Salguero <i>et al.</i> , 2021)
<b>IgA</b>	Muestras fecales infantes pretérmino	<i>Enterobacteria</i> Anaerobios	La IgA materna es primera fuente de IgA en el primer mes y la disminución de bacterias unidas a IgA está asociada con el desarrollo de Enterocolitis necrotizante. - IgA maternal promueve la diversificación de la microbiota y la adquisición de anaerobios.	MACS	-IgA controla motilidad bacteriana y limita el accesos al epitelio  Encadenamiento bacteriano, facilitando expulsión y previniendo transferencia de genes.  (Gopalakrishna <i>et al.</i> , 2019)
<b>IgM</b>	Muestras fecales humanas Muestras de ileon	<i>Bacteroides vulgatus</i> Lachnospiraceae y Ruminococcacea	sIgM une una diversa microbiota dualmente cubierta por sIgA mostraron una mayor riqueza y diversidad en comparación con las bacterias recubiertas con IgA solamente.	FACS	Anclaje de comunidades microbianas no redundantes al moco  (Magri <i>et al.</i> , 2017)

<b>IgG</b>	Muestras fecales ratón	Bifidobacteriales, Lactobacillales, Clostridiales y Desulfovibrionales	<p>Los anticuerpos IgG específicos de comensales adquiridos por la madre se coordinan con la IgA para limitar las respuestas de las células T de la mucosa y reforzar la inmunidad intestinal en los recién nacidos.</p> <p>El reconocimiento es TI e inducido por señalización de TLR en las células B</p>	FACS	<p>Limitan la interacción bacteriana con el epitelio intestinal y previenen la translocación microbiana a los tejidos subyacentes.</p> <p>(Koch <i>et al.</i>, 2016)</p>
<b>IgG</b>	Muestras fecales de ratón y de intestino delgado	<i>Lactobacillus, Alistipes</i>	<p>Colonización del intestino neonatal con bacterias recubiertas de IgG confiere protección contra patógenos entéricos en recién nacidos.</p> <p>IgG específica da forma al desarrollo del microbioma intestinal, amortigua las células IL-17A+ y mejoran la defensa del huésped</p>	FACS	<p>Respuesta a bacterias intestinales traslocadas</p> <p>(Sanidad <i>et al.</i>, 2022)</p>

### **3 JUSTIFICACIÓN**

La identificación de taxones bacterianos que son blanco de las inmunoglobulinas puede revelar información importante sobre las interacciones hospedero-bacteria. Debido a la gran importancia del establecimiento bacteriano en el intestino del neonato en los primeros días, la finalidad de este estudio descriptivo es identificar las bacterias de calostro que son seleccionadas por unión con inmunoglobulinas y se transfieren al neonato a través de lactancia; favoreciendo su selección y establecimiento en el tracto digestivo del infante. Así mismo estas bacterias podrían jugar un papel importante en la inducción de tolerancia inmunológica hacia la microbiota comensal. Normalmente, el neonato no produce inmunoglobulinas detectables hasta el tercer mes de vida, siendo el calostro durante las primeras 24 a 48 horas y la leche después, una fuente indispensable de inmunoglobulinas y microbiota para el lactante. Estudiar este fenómeno es importante, ya que aporta conocimiento sobre los mecanismos de transferencia bacteriana madre-neonato y sus efectos para el desarrollo de la microbiota infantil. Ya que un desarrollo anómalo de la microbiota inicial podría reflejarse en un aumento de susceptibilidad a padecer enfermedades metabólicas e inmunológicas. Por esta razón y porque este aspecto del desarrollo postnatal, en México está poco documentado, se estudiará la microbiota unida a inmunoglobulinas IgM, IgG y subtipos de IgA en calostro y copro del neonato.

### **4 ALCANCE**

El alcance de este trabajo es caracterizar bacterias del calostro materno y, del colon de neonatos que estén unidas a anticuerpos maternos del tipo IgG, IgM y los subtipos de IgA (IgA1 e IgA2). Esto con la finalidad de indagar los mecanismos de transferencia bacterianos a través de la transferencia vertical bacteriana. Para ello se colectaron muestras de leche de mujeres mexicanas y muestras fecales de sus recién nacidos, procedentes del hospital. Mediante análisis de secuenciación masiva se determinó la composición y el grado de variabilidad de las comunidades microbianas presentes en las diferentes grupos de muestras analizadas, y se



describió una posible una relación entre las Inmunoglobulinas maternas (A, M y G) y la microbiota del calostro, así como con las bacterias del intestino infantil, en la transferencia bacteriana de la leche materna al intestino neonatal.

## **5 HIPOTESIS**

Las inmunoglobulinas IgA1, IgA2, IgM e IgG se unen a bacterias comensales presentes en la leche humana y son transmitidas al intestino del lactante para contribuir al desarrollo y establecimiento de su microbiota intestinal.

## **6 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar la comunidad de bacterias asociadas a inmunoglobulinas maternas del tipo IgM, IgG y los subtipos de IgA (IgA1 e IgA2) en leche humana y copro de neonatos alimentados con lactancia materna exclusiva.

## **7 OBJETIVO ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar la diversidad bacteriana total de la leche materna y heces infantiles en muestras pareadas.
2. Caracterizar las fracciones bacterianas unidas a IgA (IgA1 e IgA2), IgM e IgG en leche de mujeres sanas y copro infantil por secuenciación masiva.
3. Comparar los perfiles bacterianos unidos a inmunoglobulinas en las muestras.
4. Realizar un modelo de asociación entre las bacterias reconocidas por inmunoglobulinas IgA1, IgA2, IgM e IgG en calostro y la microbiota en el intestino infantil.

## 8 METODOLOGÍA DISEÑO EXPERIMENTAL

### 8.1 Diseño y tipo de estudio

El presente estudio es un estudio observacional, analítico de tipo transversal. El muestreo realizado fue un muestreo no probabilístico por conveniencia, reclutando a todas la mujeres clínicamente sanas que acudieron al servicio de Ginecología y obstetricia del hospital HREI entre los meses julio-diciembre 2022 y en el Hospital General José María Rodríguez en el mes de diciembre 2022.

Todas las actividades detalladas en este protocolo tienen aprobación del Comité de Investigación y Bioética de: Hospital Regional de Alta especialidad de Ixtapaluca (HREI) (NR-CEI-HRAEI-06-2021) y del Comité de Ética en Investigación Clínica del Hospital Dr. José María Rodríguez (No. 217B560002018006).

#### 8.1.1 Criterios de Inclusión de las Madres

- Mujeres sanas de entre 18-40 años
- Parto vaginal o cesárea
- Ascendencia Mexicana (mínima 3 generaciones)

#### 8.1.2 Criterios de Exclusión de las madres

- Enfermedades crónico-degenerativas
- Enfermedades autoinmunes
- Consumo de alcohol, cigarrillos o algún tipo de drogas durante el embarazo
- Presentar cuadros alérgicos o diarrea
- Consumo de probióticos en el último trimestre del embarazo y durante la lactancia
- Mujeres con cervicovaginitis bacteriana
- Mujeres bajo tratamiento hormonal

#### 8.1.3 Criterios de inclusión de los neonatos/infantes

- Infantes sanos y a término
- Alimentados con lactancia materna exclusiva.

#### 8.1.4 Criterios de Exclusión

- Sufrimiento fetal o contacto con meconio
- Administración de antibióticos al nacimiento

#### 8.1.5 Criterios de eliminación

- Pacientes que decidan no seguir en el estudio.
- Presencia de mastitis o alguna patología que impida la lactancia.
- Presencia de malformaciones congénitas que impidan la lactancia.
- Uso de antibióticos en el lactante
- No lactancia materna exclusiva (fórmula)

### 8.2 Cálculo tamaño de muestra

Se calculo el tamaño de muestra para alcanzar un 80% de poder estadístico ( $1-\beta$ ) bajo la suposición de un 5% de error tipo I ( $\alpha$  de 0.05, una cola) y un moderado tamaño de efecto (0.5) usando el software *GPower v3.1.9.4*. Con base al estudio de la diversidad de la microbiota en leche humana. Como resultado del cálculo se obtuvo un tamaño de 106 muestras totales.

### 8.3 Toma de muestra

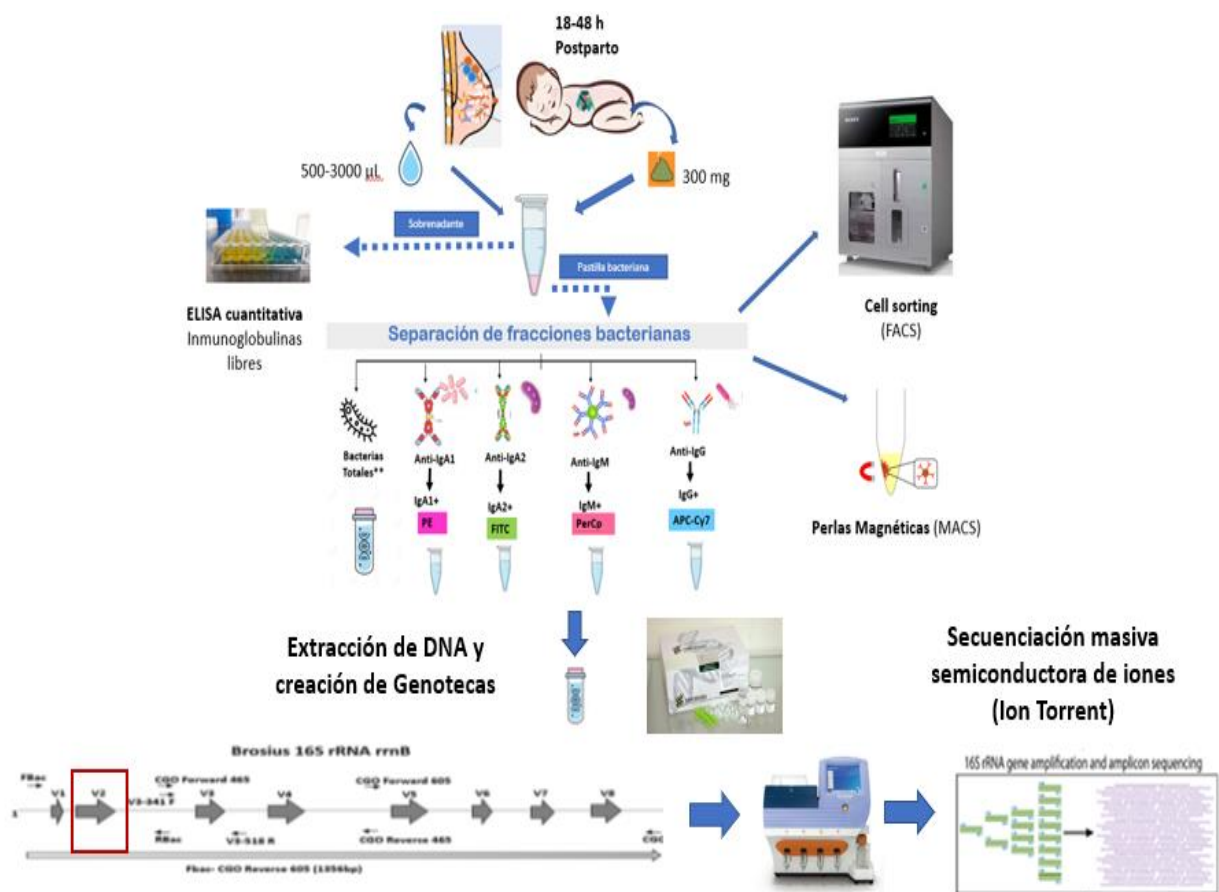
El muestreo se realizó entre Julio-diciembre del 2021 en 2 hospitales distintos: 1) Hospital Regional de Alta especialidad de Ixtapaluca (HREI) y 2) Hospital General José María Rodríguez, ambos ubicados en Estado de México.

Se tomaron en cuenta muestras pareadas (madre-lactante) de calostro y heces de neonatos de entre 24 a 48 horas post parto. Previo al muestreo se aplicaron cuestionarios para obtener datos clínicos y sociodemográficos de las mujeres participantes (escolaridad, ocupación, edad materna y gestacional, paridad, tipo de parto, sexo y peso al nacer), además se dio a conocer el consentimiento informado con base a la declaración de Helsinki.

Para la colecta de calostro, las madres recibieron instrucciones orales para su colecta, y mediante extracción manual con el uso de guantes estériles, el calostro

fue recolectado en un tubo de polipropileno estéril de 50 mL para su fácil manejo. Se adicionó 1% de coctel de inhibidores de proteasas PMSF, TPCK y TLCK (Cat #P8465, Sigma Aldrich®) con 0.01% de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) (Cat# S2002, Sigma-Aldrich®) para evitar la degradación de las inmunoglobulinas. Las muestras se mantuvieron en frío (4° C) y fueron procesaron inmediatamente después de su colecta. Posteriormente el calostro se trasfirió a tubos de polipropileno de 1.5 ml, el volumen total colectado se encontró entre 500 µL-3000 µl.

En la colecta de muestras de heces de neonatos, 200 mg de heces/meconio fueron tomados directamente del pañal con la ayuda de un aplicadores de madera estériles y colectado directamente en un tubo de polipropileno estéril de 1.5 ml. La descripción general de la metodología empleada en el trabajo se encuentra ilustrada en la Figura 7.



**Figura 7.** Esquema general de metodología Empleada. Desde la toma de muestra hasta la obtención de secuencias.

## **8.4 Pretratamiento de la muestra**

### Muestras de heces

Una vez obtenidas las muestras, a 200 mg se adicionaron 5 ml de PBS estéril, se cribaron por un tamiz estéril de 40  $\mu\text{m}$  (Cat. 352340, Falcon®) con ayuda de un émbolo estéril, para eliminar residuos y moco. El líquido cribado se centrifugó a 800 g durante 10 minutos con la finalidad de clarificarlo eliminando restos y otros componentes adicionales de las heces.

### Muestras de calostro

Una vez en el tubo de 1.5 mL las muestras se centrifugaron a 800 g durante 10 minutos para separar las células eucariotas y otros residuos contenidos en el calostro. (pellet), sobrenadante con bacterias y la fracción lipídica, esta última fue removida con un hisopo estéril, la pastilla también se desechó recuperando solamente el sobrenadante por pipeteo para la posterior recuperación de bacterias.

Para ambos tipos de muestras (calostro y heces) el sobrenadante obtenido de la centrifugación se recuperó y se centrifugó por segunda ocasión a 8000 g durante 15 minutos a 4° C. De esta centrifugación se obtuvieron 2 fases: el sobrenadante el cual se almacenó a -20° C para la posterior determinación de inmunoglobulinas libres por ELISA y la pastilla bacteriana, la cual se lavó 3 veces con 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X pH 7.4 estéril para posterior separación de fracciones de bacterias asociadas a IgM, IgG y a las subclases de IgA.

## **8.5 Cuantificación de inmunoglobulinas por ELISA**

La cuantificación de inmunoglobulinas en las muestras IgA, IgA1, IgA2, IgM e IgG en muestras de calostro y de copro se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Sánchez-Salguero y colaboradores en 2019 mediante la técnica de ELISA (E. Sánchez-Salguero *et al.*, 2019)

Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Thermo scientific® MaxiSorp USA Lote 1132249) con 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo monoclonal de ratón [7A09] anti-cadena ligera humana ( $\kappa+\lambda$ ) (cat#1942, Abcam), a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS, durante un tiempo de incubación de 12 h a 4° C.

El bloqueo de los sitios libres no específicos se llevó a cabo con 200  $\mu$ L por pozo de PBS-Tween 20 0,05 %, durante 90 min a 25° C.

Posteriormente se agregaron los sobrenadantes de las muestras de calostro o de copro, en una dilución 1:5000, adicionándose 50 $\mu$ L. Para el desarrollo de la curva estándar, se adicionaron 100  $\mu$ L por pozo de las soluciones estándar preparadas a partir de reactivos comerciales de inmunoglobulinas humanas purificadas: IgA1 (ABCAM, ab91020). IgA2 (ABCAM, ab91021 Cambridge UK), IgM (ABCAM, ab91117) o IgG (ABCAM, ab91102) en PBS; durante un tiempo de incubación de 2 h a 37° C.

Para la detección de IgA1, se adicionó un anticuerpo monoclonal hecho en ratón de la clona B3506B4 acoplado a biotina en su región Fc que reconoce IgA1 humana (ABCAM, ab99796) en una dilución de 1:2000. De manera similar, para IgA2, se adicionó un anticuerpo monoclonal de ratón acoplado a biotina en su región Fc anti-IgA2 humana de la clona A9604D2 (ABCAM, ab128731) en una dilución de 1:1000. Para IgM humana, un anticuerpo monoclonal de ratón (ABCAM, ab49655) y para IgG, un anti-IgG hecho en cabra (Invitrogen Massachusetts, MA, USA, 81–245,062). Finalmente se adicionaron 100  $\mu$ L por pozo de una dilución 1:5000 de complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano (HRP) (Streptavidin HRP ab7403) y se dejó incubando durante 1 h a 37° C. Para el revelado se utilizaron 100  $\mu$ L por pozo de 3',3'-5,5-tetrametil bencidina (TMB) con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (TMB ELISA substrate high sensitivity abcam 171523 Cambridge UK), se incubó en un intervalo de 5 a 10 min. La reacción se detuvo con adición de 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 M, las placas se leyeron en un espectrofotómetro (Sunrise absorbance reader, Tecan's Magellan® universal reader) a 450 nm. Los datos se analizaron y graficaron mediante el programa GraphPad Prism® versión 6.00 para Windows, La Jolla California USA.

## **8.6 Tinción bacteriana para separación por citometría de Flujo (FACS)**

Una vez limpia la pastilla de bacterias asociadas a anticuerpos maternos se realizó un bloqueo con 500  $\mu$ L de una solución compuesta por 0.25 % de BSA y 5 % de SFB en PBS 1X pH 7.4 y se incubó a temperatura ambiente durante 30

minutos. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 13,500 rpm por 5 minutos. La pastilla resultante se lavó con PBS en 3 ocasiones. Una vez lavado el paquete bacteriano se resuspendió en un volumen final de 1 mL. El volumen total de la muestra se dividió en tubos de polipropileno de 1.5mL estériles para posteriores tratamientos: a) bacterias totales, b) bacterias unidas a IgA1 c) bacterias asociadas a IgA2 d) bacterias asociadas a IgM y e) bacterias asociadas a IgG. Finalmente se ajustaron a un volumen final de 500 µl con PBS.

La tinción de las fracciones de bacterias dependiendo de su asociación a las diferentes inmunoglobulinas (tubos d y e) se realizó adicionando anticuerpos monoclonales hechos en ratón, contra IgM (Cat# AB99745, ABCAM®) e IgG humana (Cat# AB201842, ABCAM®) con una dilución 1:500 para ambos casos (descripción de reactivos en material suplementario). Para los tubos b y c, se usaron anticuerpos acoplados a fluorocromos anti IgA1-PE (Cat# ab99797, ABCAM) y IgA2-FITC (Cat# 9140-02, Southern biotech) (dilución 1:500 y 1:250 respectivamente. Una vez adicionados los anticuerpos en proporciones correspondientes se incubaron a 37° C por 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron para precipitar las bacterias y se lavaron 2 veces con PBS, ajustándose a un volumen final de 500 µL.

Para los anticuerpos biotinilados que no contenían fluorocromos (anti-IgM y anti-IgG), se adicionó un complejo de estreptavidina-APCy7 (Cat# 405208, Biolegend®) para la detección de bacterias IgG<sup>+</sup> y estreptavidina-PerCP (Cat#405213, Biolegend®) para IgM, en una dilución 1:500 en ambos casos. Posterior a la adición de estos fluorocromos, se incubó a 37° C por 30 min. Pasado el tiempo de incubación, las bacterias se en pastillaron por centrifugación, lavando en 2 ocasiones más con PBS.

## **8.7 Separación de bacterias en fracciones por citometría de flujo**

Las poblaciones bacterianas positivas a cada una de las inmunoglobulinas estudiadas fueron separadas mediante el método: separación celular asociada a fluorescencia (FACS) en el Citómetro de flujo SH800S Cell Sorter (SONY™) usando una boquilla (nozzle) de 100 µM, y con una baja presión de flujo de 40 psi.

Las bacterias separadas se colectaron en PBS 1X estéril a 4° C previamente filtrado con un filtro de 0.22- $\mu$ m. Posteriormente la fracción positiva colectada se centrifugó (8000  $\times$ g, 10 min, 4° C) y se almacenó a -20 °C hasta la posterior extracción del ADN. La pureza de cada fracción se verificó sistemáticamente después de la separación.

### **8.8 Tinción para Separación con perlas magnéticas (MACS)**

Para esta tinción se realizó el bloqueo, como se describió para la tinción FACS. En el caso de la tinción para su posterior separación por perlas magnéticas, se hizo uso de anticuerpos monoclonales biotinilados hechos en ratón, contra IgM humana (Cat# AB99745, ABCAM®), IgG (Cat# AB201842, ABCAM®), IgA1 (Cat# AB99796, ABCAM®) e IgA2 (Cat# AB128731, ABCAM®) usando una dilución de 1:1000 para IgA2 e IgM, y 1:2000 para IgA1 e IgG. Una vez adicionados los anticuerpos se siguió el mismo protocolo que en la sección 7.6 para tinción para citometría de flujo, con ajustes en la adición de estreptavidina para los anticuerpos anti IgA1 (Cat#405201, BioLegend®). y anti IgA2 humana (Cat#405201, BioLegend®) con una dilución de 1:5000 para cada fluorocromo.

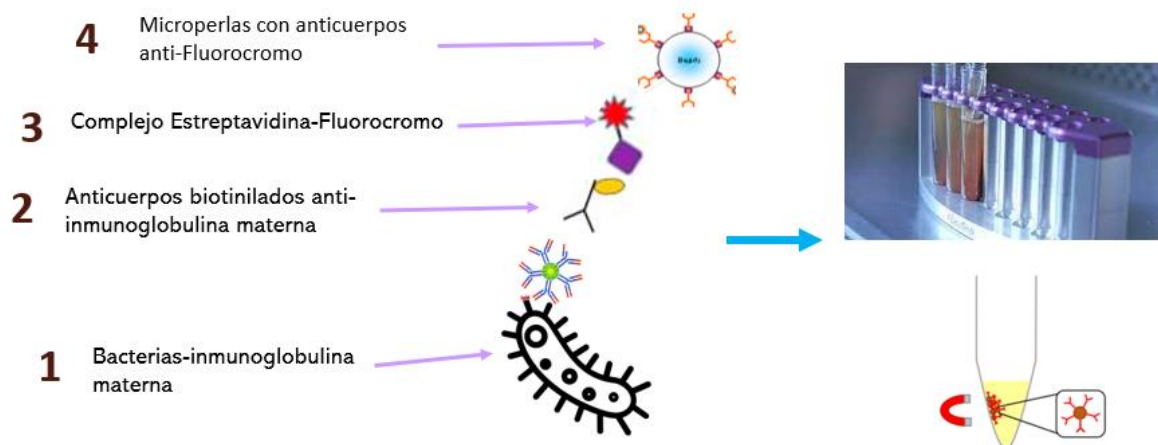
### **8.9 Separación bacteriana en fracciones con perlas Magnéticas (MACS)**

Después de los lavados de la tinción, las bacterias teñidas se re suspendieron en 1 mL de PBS 1X y se le adicionaron las micro perlas decoradas con anticuerpos monoclonales de ratón anti-FITC (Cat# 130-048-701 Miltenyi Biotec Inc., Sunnyvale, CA, USA), anti Cy7 microbeads (Cat# 130-091-652 Miltenyi Biotec Inc.), anti-PE microbeads (Cat# 097-054 Miltenyi Biotec Inc.) y anti-biotina (para el complejo IgM-estreptavidina-PerCP) en proporciones 1:5000 según corresponde. Consecutivamente las perlas se incubaron a 37° C por 30 min y posterior a la incubación la muestra se centrifugó y se realizaron 2 lavados más para remover las perlas restantes que no interactuaron.

Una vez lavada la pastilla, se resuspendió nuevamente en 1 mL de PBS y se transvasó la muestra a tubo para separación de 5 mL (Cat#38007, FALCON) y se le adicionó 4 mL de PBS estéril y previamente filtrado. A continuación, los tubos se



colocaron en el magneto para separación celular (cat#18103, SteamCell) por 20 min para realizar la selección positiva de las bacterias decoradas con cada una de las inmunoglobulinas (Figura 8) Se decantó la fracción negativa y se conservó la fracción positiva, la cual se recuperó lavando el tubo con 1 ml PBS, esta fracción se centrifugó (8000  $\times g$ , 10 min, 4° C). Se realizaron 4 rondas más de separación y por último la fracción positiva se almacenó a -20° C hasta su posterior extracción de DNA bacteriano. Este método se ilustró en la Figura 8 para una mejor comprensión de la técnica.



**Figura 8.** Separación de bacterias por perlas magnéticas (MACS). Los números indican el orden de los pasos en la técnica.

## 8.10 Citometría de Flujo

A través de citometría de flujo se cuantificó la cantidad de bacterias presentes en las muestras, la proporción de bacterias viables, la proporción de eventos sencillos y la pureza de las fracciones de bacterias: IgM+, IgG+, IgA1+, IgA2+ y las fracciones negativas. Las fracciones se guardarán a -70° C hasta el momento de la extracción de ADN. Los datos correspondientes exportados del citómetro de flujo se analizaron con el programa FlowJo V10 (BD®).

### 8.10.1 Controles de citometría

Para verificar la tinción y purificación, usamos un control de isotipo. Para esto, a 500  $\mu l$  de una suspensión de bacterias bloqueadas obtenidas de calostro se le adicionó anti-IgE anti-humano hecho en ratón (Cat # ab99807, Abcam®) y se

incubó a 37° C por 30 min. Posteriormente se centrifugó y se realizaron 3 lavados correspondientes. Este tubo se analizó por citometría de flujo.

Para demostrar la especificidad de tinción en muestras biológicas en muestras de copro, se realizó una tinción múltiple de bacterias lavadas y bloqueadas aisladas de copro de un neonato que solo había recibido fórmula, ya que estos neonatos no reciben inmunoglobulinas maternas y no producen sus propias inmunoglobulinas. Para la tinción múltiple se usaron los anticuerpos anti-humano: anti-IgA1-PE hecho en ratón (Cat#9130-09, Southern Biotech), anti-IgG-APC-Cy7 (Cat# 366911, ABCAM), IgA2-FITC (Cat# 9140-02, Southern biotech), IgA2-FITC (Cat# 9140-02, Southern biotech) y anti-IgM (Cat# AB99745, ABCAM®). Al igual que las demás tinciones se incubó a 37° C por 30 min y se realizaron 3 lavados. Anexo 6 muestra la evidencias de estos controles.

### **8.11 Extracción y purificación de DNA genómico**

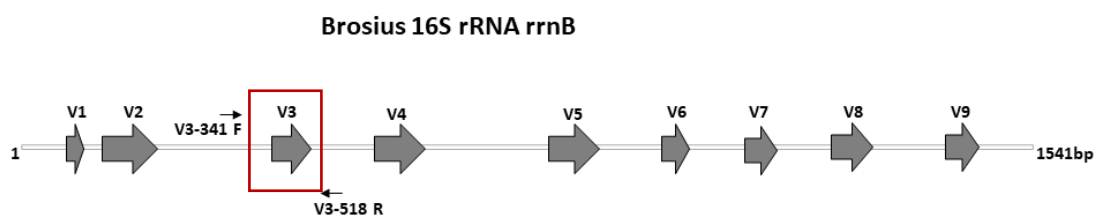
La extracción de DNA bacteriano de las diferentes fracciones positivas obtenidas en muestras de calostro se realizó mediante el kit FavorPrep Milk Bacterial DNA Extraction Kit (Favorgen©) siguiendo las instrucciones del fabricante en cuanto a la extracción de fracciones y controles de muestras de heces se realizó con Favorprep Stool DNA isolation Minikit (Favorgen©).

Una vez extraído el DNA, se cuantificó su concentración mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific); la pureza se determinó, mediante el cociente de absorbancia 260/280.

### **8.12 Amplificación de la región V3 del rDNA 16S.**

El DNA obtenido de la extracción de las fracciones bacterianas unidas a inmunoglobulinas se usó para la preparación de genotecas, mediante amplicones que posteriormente se usarán para secuenciación semiconductora de iones (Ion Torrent) con la finalidad de identificar los taxones (familia y género) bacterianos en las fracciones clasificadas.

Para la creación de genotecas se hizo uso de iniciadores dirigidos a la región polimórfica V3 del gen de rDNA 16S (Figura 9), amplificando esta región mediante PCR punto final. Cada cebador “V3-341F” contiene una secuencia marcadora única (set de códigos o “barcodes” 1-100) que permite la identificación de la muestra dentro de la genoteca, esta es complementaria a la posición 340-356 de la molécula 16S rRNA en *E. coli* (*rrnB* GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/J01859>), el oligonucleótido “forward” también contiene una secuencia correspondiente a adaptador especificado por ion Torrent. El V3-518R primer es un “reverse” complementario a las posiciones 517-533 de la misma molécula (Figura 9) Los iniciadores usados y sus secuencias fueron los antes usados en el grupo de trabajo (Corona-Cervantes *et al.*, 2020). Las condiciones de la reacción y el programa de amplificación se encuentran en las Tablas 3 y 4.



**Figura 9.** Esquema del gen 16S rDNA bacteriano. En la figura se resalta la región polimórfica V3, amplificada por PCR en este trabajo (García-Mena *et al.*, 2016).

Con la intención de verificar la calidad y tamaño del amplicón (281 pb), posterior a la reacción de PCR, los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 2% teñido con 0.80 µl de colorante Midori Green. Para la carga de los productos se empleó 4 µL de producto de PCR y 1 µL de buffer de carga de (0.25% azul de bromofenol; 0.25% xileno cianol; 40% y glicerol). Como regulador de corrida se usó TBE (Tris [Borato]EDTA). El corrimiento electroforético se realizó aplicando 90 Volts durante 50 minutos, para después observar el gel con el sistema de foto-documentación Molecular Imager® Gel Doc™ XR Bio-Rad y cuantificar la intensidad banda en pixeles por medio de densitometría usando el programa: Image Lab V.4.1.2012 Biorad® laboratories.

**Tabla 3.** Iniciadores y mezcla de reacción para la amplificación de la región V3

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen / muestra
Sybr Green	10X	1X	12 µl
V3 341F	10 µM	0.2 µM	0.8 µl
V3-518 R	10 µM	0.2 µM	0.8 µl
H <sub>2</sub> O	--	--	6.4 µl
DNA molde	3-5 ng/ µL	0.6-1 ng/ µl	5 µl

Concentración de DNA por Reacción: 25 ng. Volumen por reacción: 25 µL.

**Tabla 4.** Condiciones para la amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA.

Etapa	Temperatura	Tiempo (minutos)	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95° C	10 :00	1 ciclo
Desnaturalización	95° C	0:15	
Alineamiento	62° C	0:15	38 ciclos
Extensión	72° C	0:15	
Extensión Final	72° C	10 :00	1 ciclo
	10° C	10 :00	1 ciclo

### 8.13 Preparación de Genotecas y Secuenciación Masiva

Para generar las genotecas, se calcularon cantidades equivalentes con base a la densidad de la banda calculada por densitometría de cada amplicón, y posteriormente se mezclaron volúmenes de cada muestra-barcode del 1-100. Una vez creada la mezcla, se purificó la genoteca usando E-Gel iBase Power System a una concentración del 1% (Invitrogen). El tamaño y la concentración de las genotecas se confirmaron con el sistema Bioanalizador Agilent 2100 y el kit de ADN de alta sensibilidad (Agilent, EE. UU).

La secuenciación se llevó a cabo de acuerdo con lo previamente descrito en el grupo de trabajo (Chávez-Carbajal *et al.*, 2019). De manera general, la secuenciación se realizó usando el kit Ion PGM Template OT2 200 Kit v2 DL (Life Technologies, California, USA) en el equipo Ion One Touch2 (PCR en emulsión y enriquecimiento de molde) y se cargó en el Ion 318Chip Kit v2, para su secuenciación en el Ion Torrent PGM System.

#### **8.14 Análisis de secuencias, filtros y asignación taxonómica**

Una vez que la secuenciación se completó el software PGM filtró lecturas de baja calidad y secuencias policlonales, las lecturas que pasaron las pruebas de calidad fueron exportadas como archivos FASTQ y transformadas a archivos FASTA. La calidad de todas las secuencias fue verificada con el software FastQC, y posteriormente contadas mediante el programa Trimmomatic v0.36. a 200 nt de longitud, esto con la finalidad de que todas las bases tuvieran un calidad Q30.

Una vez recortadas las secuencias fueron importadas para su análisis al software QIIME2 pipeline v2021.8. Las quimeras y secuencias de mala calidad fueron removidas mediante Dada2, y las secuencias fueron clasificados en ASVs (amplicon sequence variants) (Callahan *et al.*, 2016). Como producto de esta asignación, se generó una tabla con las frecuencias de conteo de secuencias únicas en cada una de las muestras. Los ASVs se compararon con la base de datos 16S rDNA GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov/>) (McDonald *et al.*, 2012). La comparación se realizó usando el método de BLAST, a fin de realizar una asignación taxonómica de cada ASV encontrado en las muestras.

#### **8.15 Filtrado de ASVs Contaminantes y Abundancias relativas**

Dado a que se trabajó con muestras de baja biomasa, se tomaron en cuentas las siguientes medidas para reducir la presencia de contaminantes en las muestras:

*Filtro #1:* Remoción de secuencias contaminantes mediante Decontam, la tabla de ASVs fue filtrada usando el método de frecuencia y prevalencia con el paquete Decontam en R, el cual identifica contaminantes de acuerdo con la distribución de la frecuencia de cada ASV en función de la concentración de ADN o mediante la prevalencia del ASV en los controles negativos.

*Filtro#2:* filtrado de ASVs de baja frecuencia en las muestras, se eliminaron los ASVs con frecuencias menores a 3 counts en las muestras, de acuerdo con la regla del pulgar (Cao *et al.*, 2021).

*Filtro#3:* se filtraron los ASVs asignados a cloroplastos y mitocondrias que pudieran estar por error en las muestras.

Una vez realizados los filtros se procedió a realizar las gráficas de abundancia relativa con valores obtenidos de QIIME2 mediante la función: *Taxa Collapse*. Las gráficas se realizaron en Excel graficando el promedio de cada taxon presente en cada grupo.

#### **8.16 Determinación de diversidad Alfa y Beta**

La diversidad alfa bacteriana (dentro de cada muestra) se calculó con los índices de Shannon, Simpson, y las especies observadas usando los paquetes phyloseq (v1.22.3) y ggplot2 (v3.1.0) en R (v3.4.4) (McMurdie & Holmes, 2013). El índice de disimilitud de la diversidad  $\beta$  se calculó mediante la métrica de distancia UniFrac ponderado, y se visualizó mediante el uso de coordenadas principales (PCoA) en Emperor de QIIME2 como porcentaje de la variabilidad total en diferentes ejes de la gráfica. Para este análisis se realizó una normalización del número de secuencias (rarefacción) a 10,000 secuencias por muestra.

#### **8.17 Análisis de predicción de vías metabólicas de la microbiota por PICRUST2**

Se usó el programa PICRUST2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) (v2.4.1) (Douglas *et al.*, 2020) para realizar el análisis de predicción de vías metabólicas con la ayuda de la base de datos Metacyst (Caspi *et al.*, 2020). Para realizarlo se usó la tabla de ASVs obtenida en con QIIME 2 (v2021.4) y las secuencias representativas. Los datos generados, las visualizaciones y los análisis estadísticos se realizaron en: Statistical analysis of metagenomic profiles software STAMP (v2.1.3), donde se usó Welch's t test (Parks *et al.*, 2014) .

#### **8.18 Análisis de Source Tracking**

Realizamos un análisis para predecir el origen de los ASVs en cada muestra de copro de neonatos usando las fracciones bacterianas unidas a inmunoglobulinas del calostro como fuente. Con tal información se estimó la proporción de bacterias presentes en el copro de los neonatos que provienen del calostro. El análisis se realizó en QIIME2 con el software Source Tracker 2 (Knights *et al.*, 2011). Los datos

se visualizaron como una barra por cada muestra de neonato y el promedio de todas las muestras.

### **8.19 Correlación de metadatos con la microbiota**

Se analizaron las abundancias relativas de las bacterias de copro de neonato y se correlacionó con datos numéricos como el tiempo después del parto (en horas) mediante una correlación de Spearman usando el paquete Microbiome (v1.14.0) en R. El set de datos correlacionados se filtró usando dplyr (v1.0.7) para remover datos con un valor de  $p < 0.05$ . Finalmente se usó ggplot2 (v3.3.5) para crear un mapa de calor con los valores de correlación. Así mismo se realizó una correlación de Pearson para relacionar el porcentaje de contribución de las fuentes microbianas con el metadato: tiempo después del parto, tal análisis se realizó con el software GraphPad Prism v.9.0.0 (San Diego, CA, USA).

### **8.20 Análisis estadístico de la microbiota.**

Se utilizó el programa Linear discriminant analysis effect size (LEfSe Galaxy) para determinar las diferencias en la abundancia relativa de taxones bacterianos entre los grupos. LefSe realiza un análisis de discriminación lineal (LDA) para estimar el tamaño del efecto de cada taxón entre grupos, se eligió un LDA  $\geq 2.0$  y un valor de  $p \leq 0.05$  para considerar valores significativos. (Segata *et al.*, 2011).

Las abundancias relativas de bacterias y los índices de diversidad analizaron primeramente con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para una muestra. Los datos resultaron presentar mayormente una distribución no normal, por eso para analizar los datos se eligió prueba Kruskal Wallis para comparar datos no paramétricos en múltiples grupos, con una posterior prueba post hoc para ver qué pares de grupos difieren significativamente. Los datos se expresaron en medias  $\pm$  desviación estándar, el  $p < 0.05$  se considera estadísticamente significativo. Las operaciones estadísticas se harán utilizando el programa SPSS (versión 14.0) y las correlaciones en R y en Prisma v9.

## 9 RESULTADOS

### 9.1 Características de la población estudiada.

Como resultado del muestreo realizado en el hospital general “Dr. José María Rodríguez” y en el hospital regional de alta especialidad de Ixtapaluca (HREI) de Julio del 2022 a Diciembre del 2022, se obtuvieron 32 muestras, éstas muestras consistieron en: calostro y copro de neonatos provenientes de 16 binomios. Las características sociodemográficas de la población que proporcionó las muestras se encuentran descrito en la tabla 5 donde se describen los datos de las madres participantes, y de los neonatos muestreados durante este trabajo.

**Tabla 5.** Características sociodemográficas y clínicas de la Población.

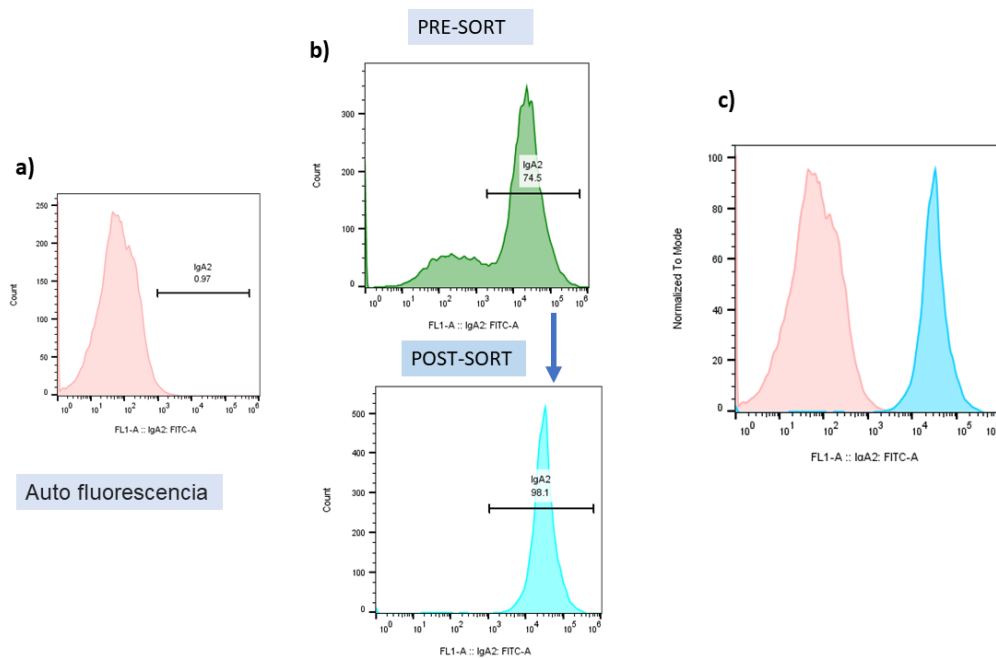
<b>Datos Maternos</b>	<b>n (%)</b>
Edad en años*	22.81± 5.25
Edad gestacional	38.83. ±0.98
Lugar de Nacimiento	
Estado de México, Ixtapaluca	8 (50)
Estado de México, Ecatepec	6(37.5)
Ciudad de México	2 (12.5)
Ocupación	
Ama de Casa	2 (62.5)
Estudiante	10 (6.25)
Empleada	5 (31.25)
Tipo de Parto	
Vaginal	11 (68.75)
Cesarea	5 (31.25)
Vacunación	
AstraZeneca/Sputnik/Pfizer	10 (62.5)
Ninguna	6(37.5)
<b>Datos Neonatos</b>	<b>n (%)</b>
Edad al momento de colecta de muestra (h)	27.5 ± 10.83
Peso (g)	3047.06 ±340
Talla (cm)	49.44±1.62
Sexo	
Femenino	8 (50)
Masculino	8 (50)

\*Expresado como media ± desviación estándar



## 9.2 Obtención de fracciones bacterianas unidas a Inmunoglobulinas por FACS

Para la obtención de bacterias unidas a las diferentes inmunoglobulinas estudiadas se realizó una separación celular basada en citometría de flujo por sus siglas en inglés FACS (Fluorescence Associated Cell Sorting). Posterior a la separación, la pureza fue verificada leyendo una alícuota de la fracción como se muestra en la Figura 10. El análisis para cada inmunoglobulina en muestras de leche y copro se muestran en el anexo 4.



**Figura 10.** Análisis representativo de citometría de Flujo de las fracciones obtenidas por FACS en Calostro. a) Bacterias sin tinción, usado como control negativo de auto fluorescencia b) Bacterias positivas a IgA2 en muestra de calostro antes de separarse, y bacterias positivas después de separarse (análisis de pureza expresado como porcentaje). c) esquema representativo de bacterias asociadas a IgA2(azul claro) y bacterias negativas a IgA2 (rojo).

En cada una de las fracciones de bacterias positivas separadas se registró el número de eventos recuperados y el porcentaje de pureza obtenido después de la separación. El resumen de los datos se encuentra ilustrado en la Tabla 6 (calostro) y Tabla7 (copro).

**Tabla 6.** Datos de separación por FACS en muestras de Calostro

Inmunoglobulina	Número de eventos*	Rango de #Eventos (min-max)	(%) Pureza*
IgA1	112,126±172,009.8	12,804-457,000	93.7±3.48
IgA2	197,056.2±138,764.5	39,138-419,057	96.2±3.03
IgM	51,170.4±81574.5	5,402-27,4943	94.8±5.20
IgG	27,425±27,425	863-214,700	90±9.06

\*Representados como: Media ± DS. Número de muestras representadas por inmunoglobulina  $n = 10$

**Tabla 7.** Datos de separación por FACS en muestras de Copro de neonatos

Inmunoglobulina	Número de eventos*	Rango de #Eventos (min-max)	(%) Pureza*
IgA1	44,688.5± 81,891.2	(1,650 - 269,379)	84±7.20
IgA2	23,650.375 ± 65,972.0	(831 - 98,891)	82±9.05
IgM	6,004.1 ± 5,083.75	(2,056 - 18,250)	79±6.96
IgG	31,766.3 ± 49,822.83	(1,551 - 160,069)	85±9.21

\*Representados como: Media ± DS. Número de muestras representadas por inmunoglobulina  $n = 10$

### 9.3 Composición de la microbiota unida a inmunoglobulinas en calostro.

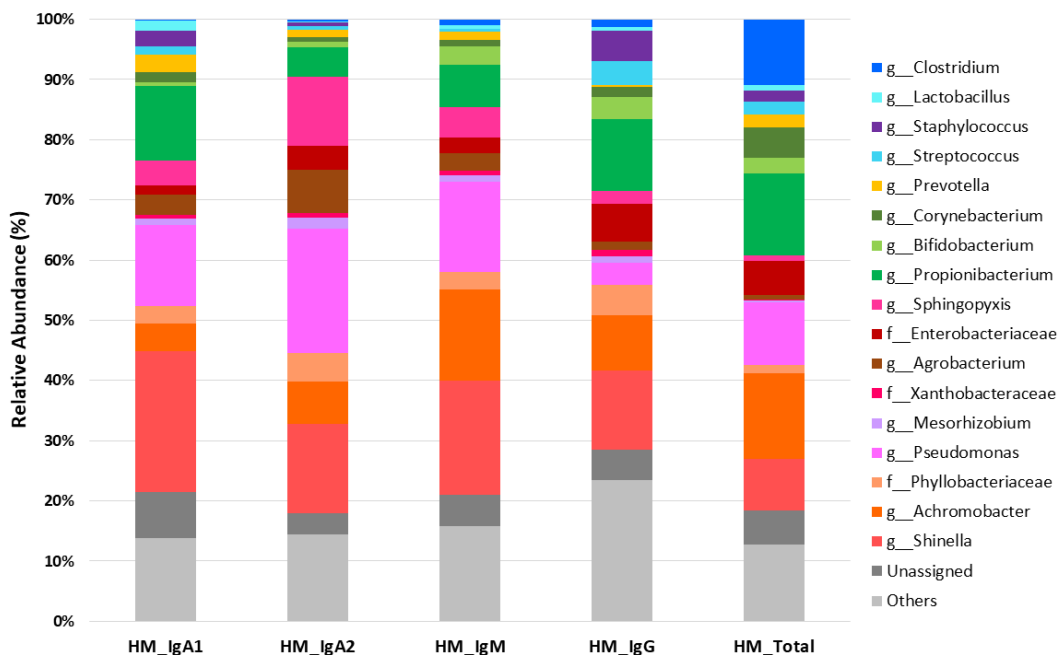
Para responder la pregunta: ¿Qué bacterias son reconocidas por las distintas inmunoglobulinas?, una vez que se secuenciaron las bacterias obtenidas de la separación por citometría de flujo o por perlas magnéticas se determinó la abundancia relativa de la microbiota a nivel de phylum.

Los resultados indican que en las muestras de calostro (muestras totales sin fraccionar) el phylum más abundante fue Proteobacteria con un 47.81% seguido por

Actinobacteria, Firmicutes y en una menor proporción Bacteroidetes (4.16%). Con respecto a lo encontrado en las fracciones bacterianas reconocidas por las inmunoglobulinas se repitió el mismo patrón; Proteobacteria como el phylum mayoritario en todos los grupos independientemente de la inmunoglobulina. Siendo IgA2+ la fracción con mayor cantidad de proteobacterias con un 79.17%.

La abundancia relativa entre fracciones fue diferente en el porcentaje de proteobacterias reconocido, siendo significativamente mayor en el grupo de IgA2 en comparación con las bacterias totales ( $p = 0.007$ ) y con IgG ( $p = 0.025$ ). También IgM mostró una mayor abundancia de Proteobacterias unidas en comparación con el total ( $p = 0.046$ ). Por lo contrario, la presencia de Firmicutes fue menor en IgA2 ( $p = 0.005$ ) e IgM ( $p = 0.008$ ) comparados con el total. En esta sección podemos apreciar que, en calostro, las inmunoglobulinas reconocen mayormente a Proteobacteria, especialmente IgA2 e IgM.

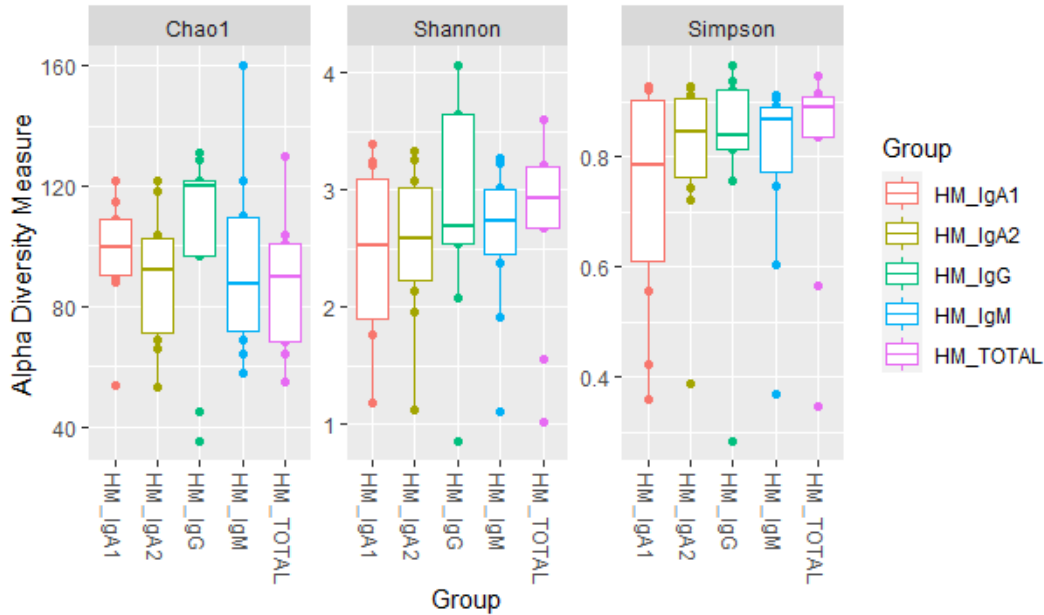
En cuanto a la descripción de género y familia, los taxones más abundantes tanto en las muestras totales como en las fracciones fueron principalmente de la clase: alfa y beta proteobacteria como: *Achromobacter*, *Shinella*, *Sphingophix*, *Agrobacterium* y la familia Phyllobacteriaceae así también una abundante presencia de gamma proteobacteria como: *Pseudomonas* y la familia Enterobacteriaceae. Además, algunas bacterias del phylum Actinobacteria se encontraron en las muestras, tales como: *Corynebacterium*, *Propiniobacterium* y *Bifidobacterium*. En cuanto a la presencia de Firmicutes, encontramos de manera abundante *Clostridium* (10.89%) en la muestra total, pero este grupo se encontró poco representado en las fracciones reconocidas por inmunoglobulinas con abundancias cercanas a 1%. Otros Firmicutes fueron las ya antes reportados *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* (Figura 11).



**Figura 11.** Abundancia relativa de bacterias unidas a inmunoglobulinas en calostro. Se muestran los 17 taxones con mayor abundancia, el resto de los taxones se agruparon en “others”. Cada columna muestra el promedio de las abundancias relativas expresadas en porcentaje de las bacterias fraccionadas por inmunoglobulina. HM\_Total expresa la comunidad bacteriana total en las muestras sin fraccionar

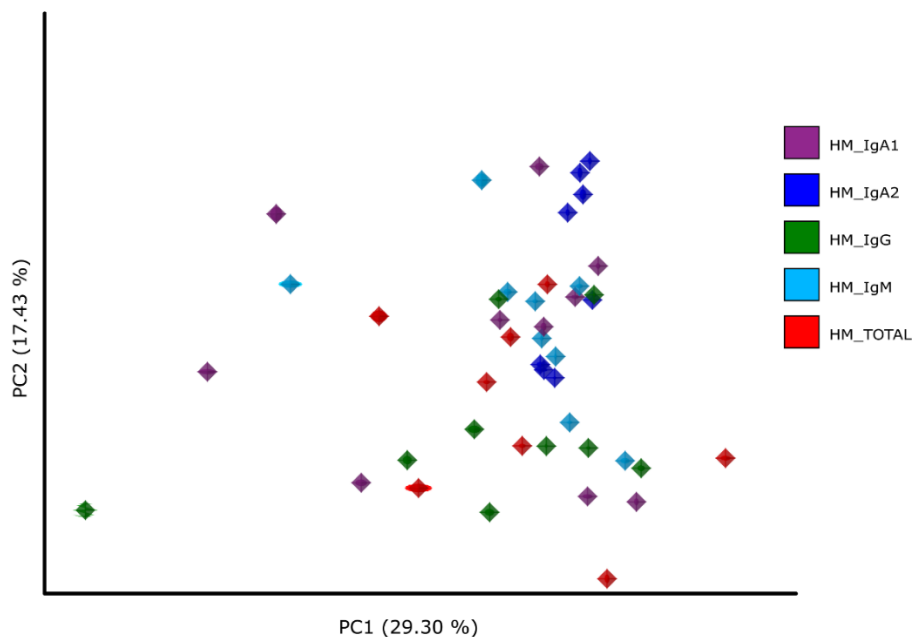
#### 9.4 Diversidad Bacteriana en muestras de calostro

Para evaluar que tan diversas eran las fracciones bacterianas unidas a cada inmunoglobulina se analizó la diversidad alfa, a través del número de ASVs observados. De esta manera poder describir la riqueza bacteriana y los índices Shannon, y Simpson como medida de diversidad y dominancia respectivamente. Con ellos se compararon las comunidades bacterianas presentes en los grupos de calostro y las fracciones (IgA1+, IgA2+, IgM+ e IgG+). Los resultados mostraron que en términos de riqueza bacteriana como la diversidad entre los diferentes grupos no difirieron significativamente, aunque mostrándose una tendencia a una mayor diversidad en las muestras de calostro sin fraccionar. Asimismo, se muestra una tendencia a una mayor riqueza en la en la fracción IgG+ (Figura 12). Indicando que los 4 isotipos recubren una diversidad de bacterias comensales.



**Figura 12.** Diversidad alfa de la microbiota de calostro asociada a inmunoglobulinas maternas. La gráfica de caja y bigotes expresa la distribución de los valores de diversidad en cada fracción (bacterias decoradas con IgA1 (IgA1+), IgA2+, IgM+, IgG+ y bacterias totales=Total Calostro). Para los 3 índices: Chao1, Shannon y Simpson.

La diversidad beta se utilizó para cuantificar y comparar que tan similares o diferentes eran las muestras. Esto se expresó como distancia entre 2 grupos de muestras. Para ello se calculó la distancia, usando la métrica de UniFrac ponderada entre las muestras pareadas para realizar el análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figura 13). El PCoA mostró que en general no hay una distancia muy grande entre los grupos, pero indicó una diferencia significativa entre las muestras de calostro total y la fracción IgA2+ (ANOSIM  $R = 0.4524$   $p = 0.001$   $q = 0.007$ ), e IgM+ (ANOSIM  $R = 0.2521$   $p = 0.012$   $q = 0.049$ ). De acuerdo con este comportamiento observado, se sugiere que la población bacteriana seleccionada por IgA2+ e IgM+ es diferente y muy particular comparada con la población total.



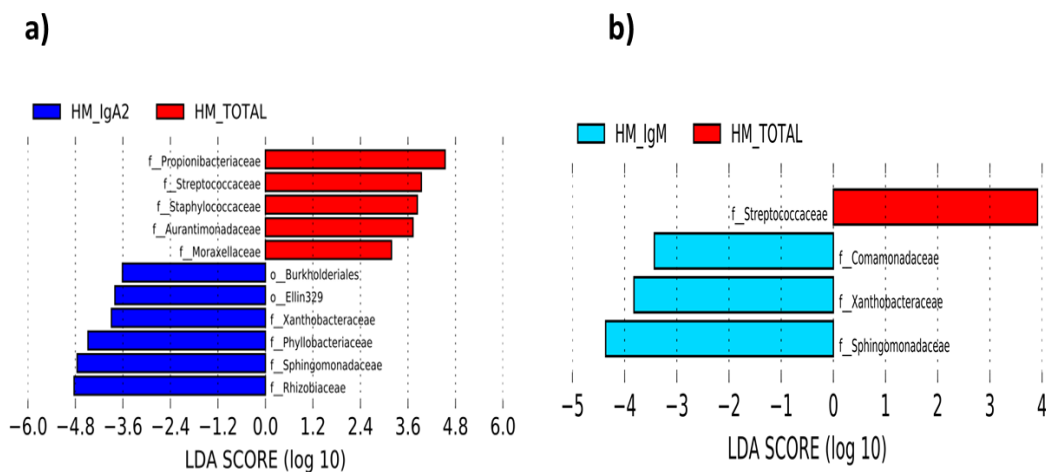
**Figura 13.** Diversidad Beta en bacterias positivas a inmunoglobulinas maternas en calostro. La disimilitud se muestra como un Análisis de coordenadas principales (PCoA). En el eje de las “X” se muestra el porcentaje de contribución PC1 y PC2 en el eje de las “Y”. Las muestras de calostro total se representan como diamantes rojos (n = 8) después de la rarefacción a 10,000 lecturas, la fracción de IgA1 + se representa como diamantes morados (n = 10), IgA2+ diamantes azules (n = 10), IgM+ diamantes azul claro (n = 9) e IgG+ como diamantes verdes (n = 10).

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

Para identificar cuales bacterias fueron responsables de las diferencias entre las comunidades de IgA2 e IgM y la comunidad total de bacterias en el calostro, 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 rangos 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.

Como resultado hubo una mayor presencia de proteobacterias (Alfa y Beta Proteobacteria) en las fracciones IgA2 e IgM en comparación con la comunidad total. Entre los grupos bacterianos pertenecientes a este phylum se encontraron: las familias Xanthomonadaceae y Sphingomonadaceae para ambas inmunoglobulinas y la familia Comamonadaceae solo en IgM. En el caso particular de IgA2+, bacterias del orden *Burkholderia*, *Ellin 329* y las familias Phyllobacteriaceae y Rhizobiaceae se encontraron enriquecidas en esta fracción.

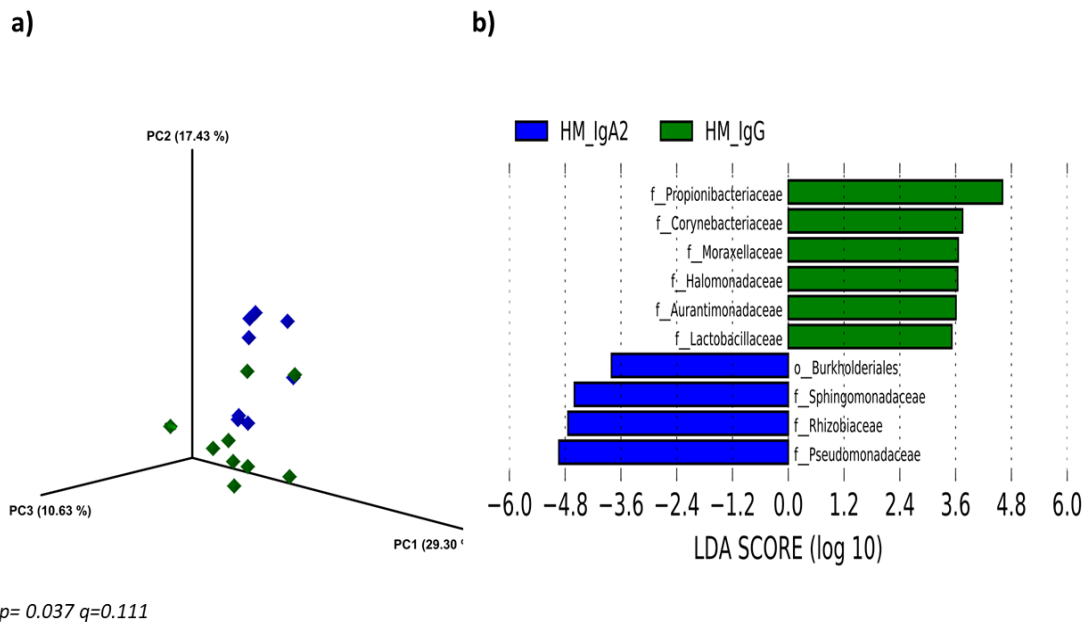
En cambio, en la fracción total se encontró más la presencia de la familia Streptococcaceae (Firmicutes), y en comparación con IgA2, también las familias Staphylococcaceae (Firmicutes) Aurantimonadaceae (Proteobacteria), Propiniobacteriaceae (Actinobacteria) y Moraxellaceae (Proteobacteria) (Figura 14).



**Figura 14.** Comparación LefSe (Linear discriminant analysis effect size) entre taxones bacterianos de fracciones bacterianas asociadas con los isotipos IgA2 e IgM en muestras de calostro. Las barras horizontales representan el tamaño del efecto para cada taxon a) azul fuerte indica los taxones enriquecidos en la fracción IgA2+ y b) azul claro en la fracción IgM+. Color rojo indica bacterias enriquecidas en la muestra total (LDA=2). o = orden; f = familia;

## 9.6 Comparación de comunidades entre inmunoglobulinas

También se realizó una comparación entre las diferentes comunidades bacterianas reconocidas por las inmunoglobulinas a través de la diversidad beta. Se encontraron diferencias estadísticas solamente entre el set de bacterias unido a IgA2 y las bacterias unidas a IgG en estas muestras de calostro (ANOSIM  $p = 0.037$   $q = 0.111$ ). La fracción IgA2+ nuevamente mostró una predominancia en las mismas alfa y beta proteobacterias que cuando se compararon con la población total, en cambio IgG unió una variedad de bacterias, desde comensales como *Lactobacillus* (Firmicutes), *Propionibacterium* y *Corynebacterium* (ambas Actinobacteria), hasta Proteobacterias como *Acinetobacter*, Moraxellaceae, Halomonadaceae y *Paracoccus* (Figura 15).



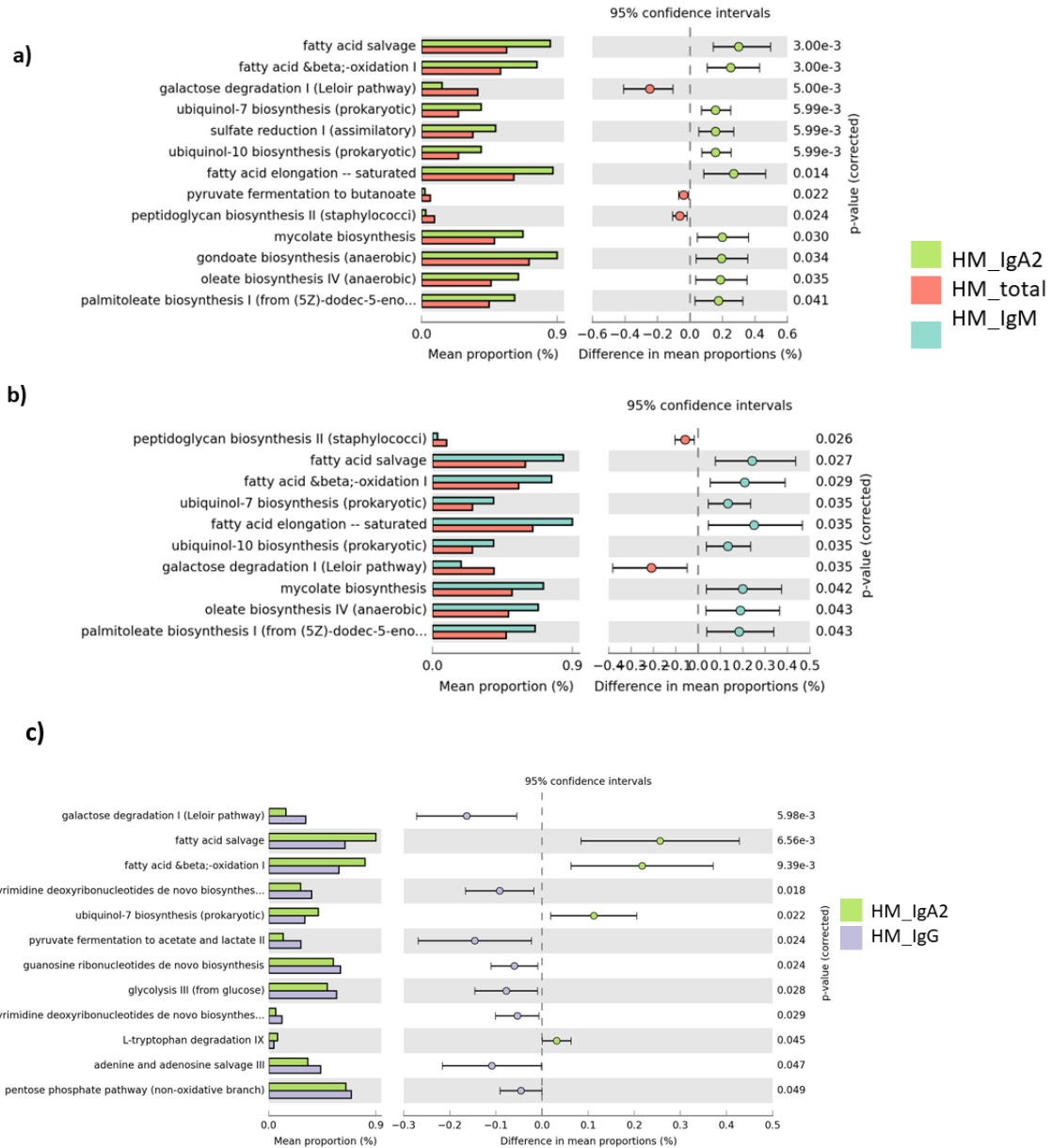
**Figura 15.** Diferencias entre comunidades bacterianas unidas a IgA2 e IgG. a) Análisis de coordenadas principales (PCoA) para diversidad B. comparar comunidades IgA2+ (diamantes azules) e IgG+ (diamantes verdes) b) Análisis de discriminación lineal entre taxones bacterianos significativos para las fracciones de bacterias asociadas con los isotipos IgA2(barras extendidas azules) e IgG (Barras extendidas verdes) LDA=2. Valores ( $p < 0.05$  y  $q < 0.05$ ) son considerados significativos. o = orden; f = familia



## 9.7 Análisis de la asociación de diversidad de la microbiota con las rutas metabólicas en muestras de calostro por PICRUST

Por último, para determinar la función o las características metabólicas de las bacterias seleccionadas por IgA2, IgM, e IgG se realizó una predicción de metagenoma; en este se indican las posibles vías metabólicas mayormente predominantes en las bacterias de cada grupo. En bacterias reconocidas por IgA2 se encontraron 10 vías metabólicas significativamente mayores, estas vías se caracterizan por un marcado metabolismo de lípidos, especialmente en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, ya sea saturados (elongación de ácidos grasos de cadena larga saturados) o insaturados como: palmitato, oleato y gondoato ( $C_{20}H_{37}O_2$ ), así como ácidos micólicos.

Estas características también fueron observadas en las vías metabólicas predichas para bacterias IgM+, compartiendo con IgA2 8 vías. En cambio, IgG al igual que en la población total se observan más vías metabólicas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos como: la vía de las pentosas, glucólisis y degradación de galactosa. Adicionalmente a estas vías similares a la población total, también IgG presentó vías relacionadas con la biosíntesis *de novo* de nucleótidos como pirimidinas, guanosina, adenosina (Figura 16).



**Figura 16.** Análisis funcional de metagenoma predictivo PICRUST2. Las vías metabólicas entre las bacterias a) IgA2+ b) IgM+ se enriquecen en metabolismo de ácidos grasos, mientras la población total y las c) IgG+ con el metabolismo activo de los carbohidratos. Las vías en el grupo de bacterias IgA2+ se muestran en color verde claro, en rojo las bacterias totales, ve azul las IgM+ y en morado las IgG+ Todos los valores se representan como media  $\pm$  DE. Los valores corregidos de  $p$  se muestran al costado derecho de la figura considerando  $p > 0.05$  como significativo.

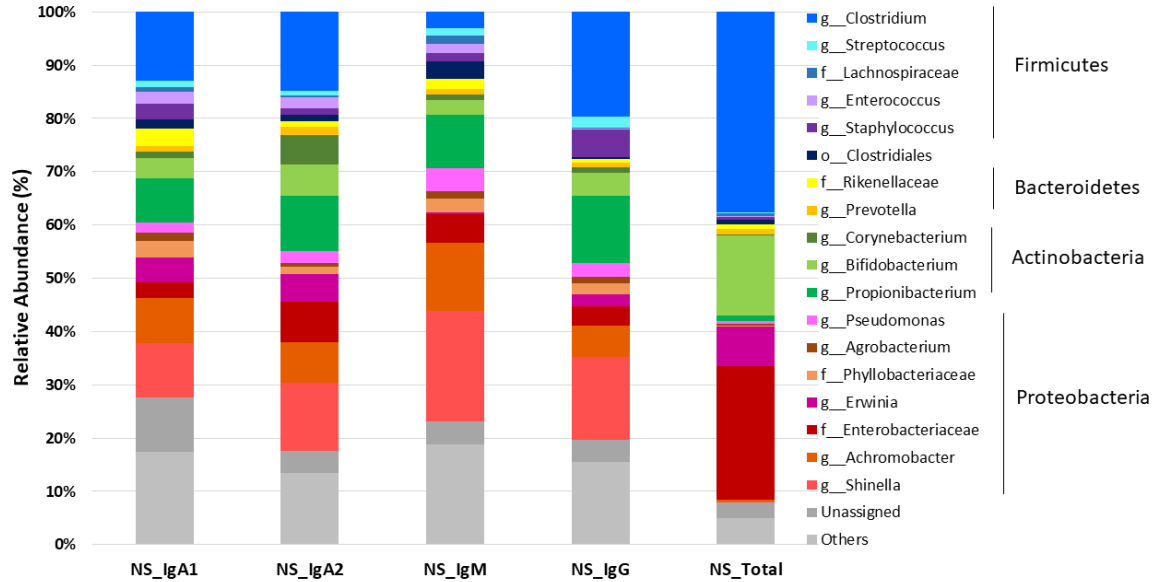
## 9.8 Composición de la microbiota en muestras de copro de Neonatos y en fracciones bacterianas unidas a inmunoglobulinas

Después analizamos la composición de bacterias unidas a los isotipos y subclases en las muestras de copro de neonatos que fueron previamente separadas mediante FACS, e identificadas por secuenciación de la región V3 del rDNA 16S. Notamos que estos isotipos fueron capaces de unirse a bacterias pertenecientes a los 4 phyla más abundantes. Esto se observó tanto en la comunidad bacteriana total, como a las encontradas en las fracciones.

Al igual que en el calostro, Proteobacteria fue el phylum con mayor presencia en las fracciones, pero se encontró en una menor proporción en la comunidad total, ya que, en esta última, hubo una predominancia de Firmicutes. Actinobacteria también se encontró en las muestras y en menor proporción Bacteroidetes.

Se encontró una mayor abundancia de Bacteroidetes en la fracción de bacterias cubiertas con IgA2 ( $p = 0.045$ ,  $q = 0.453$ ), y en las bacterias IgM+ ( $p = 0.018$ ,  $q = 0.178$ ) en comparación con las bacterias totales. Bacteroidetes también se encontró significativamente mayor en IgA2 ( $p = 0.044$ ,  $q = 0.437$ ) e IgM ( $p = 0.017$ ,  $q = 0.171$ ) comparado con bacterias IgG+.

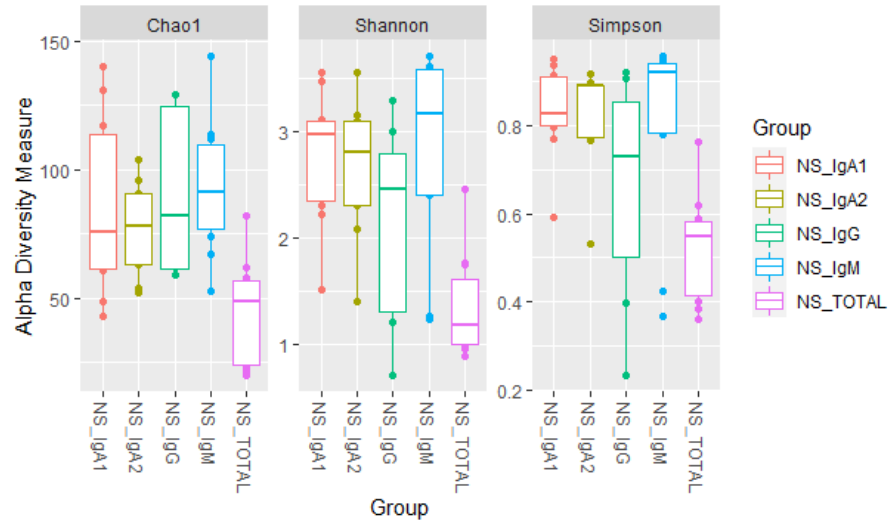
A nivel taxonómico más bajo, en todas las fracciones encontramos una gran abundancia de proteobacteria principalmente de *Shinella*, *Achromobacter* y *Enterobacteria* principalmente, este último se encontró con gran abundancia en la microbiota total (26.16%), que junto con *Clostridium* (Firmicutes) (37.6%) y *Bifidobacterium* (Actinobacteria) (14.99%) conformaron los 3 taxones predominantes en las muestras totales de copro (Figura 17).



**Figura 17.** Abundancia relativa en fracciones de bacterias de copro unidas a inmunoglobulinas. La figura muestra el top 17 de las bacterias más abundantes. Los taxones restantes con baja abundancia se agruparon en “Others”. El eje de las “y” muestra el promedio en porcentaje de abundancia relativa de cada bacteria y el eje de las “x” el grupo.

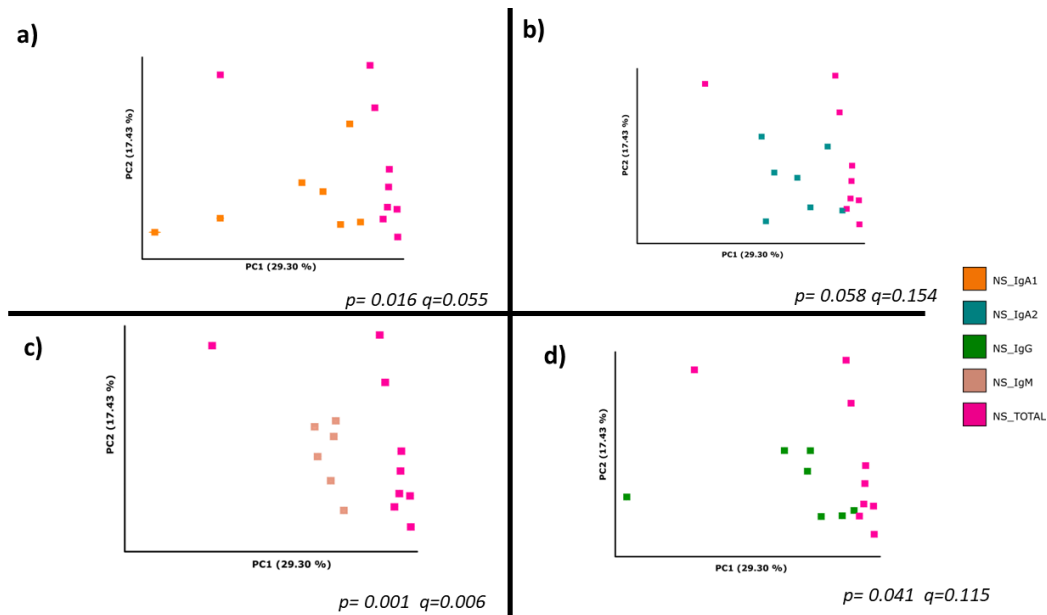
### 9.9 Diversidad bacteriana en muestras de copro de neonatos alimentados con lactancia Materna Exclusiva.

Evaluando la diversidad bacteriana en las muestras, se observó que todas las fracciones bacterianas estudiadas son diversas, habiendo una mayor riqueza de especies (dada por el número de especies observadas) ( $p = 0.004$ ) y una mayor diversidad dado por el índice de Shannon en comparación con la microbiota total ( $p = 0.001$ ) (Figura 18). Esto podría deberse en parte a la baja equitatividad de especies y a la alta presencia de grupos dominantes en las muestras totales ( $p = 0.003$ ). Las fracciones de bacterias unidas a inmunoglobulinas muestran diversidades similares entre sí, sin diferencias estadísticas.



**Figura 18.** Diversidad bacteriana en fracciones de copro de neonato. Cada caja representa la distribución de los valores de diversidad alfa de cada grupo (bacterias decoradas con IgA1, IgA2, IgM, IgG y bacterias totales) para los índices de Chao1, Shannon y Simpson.

A través de la diversidad beta también se mostró una diferencia entre las comunidades bacterias asociadas a las inmunoglobulinas IgA1+ ( $R = 0.167$ ,  $p = 0.016$   $q = 0.055$ ) IgM+ ( $R = 0.4228$ ,  $p = 0.001$   $q = 0.006$ ) e IgG+ ( $p = 0.041$   $q = 0.115$ ). De acuerdo con este comportamiento observado, se sugiere que la población bacteriana seleccionada por IgA1+, IgM+ e IgG+ es diferente y muy particular comparada con la población total. Mientras que la similitud entre las fracciones de inmunoglobulinas fue ligeramente análoga entre ellas, en el caso de IgA2, hubo una tendencia a 2 clústeres entre las muestras ( $R = 0.142$ ,  $p = 0.058$ ,  $q = 0.154$ ), (Figura 19).

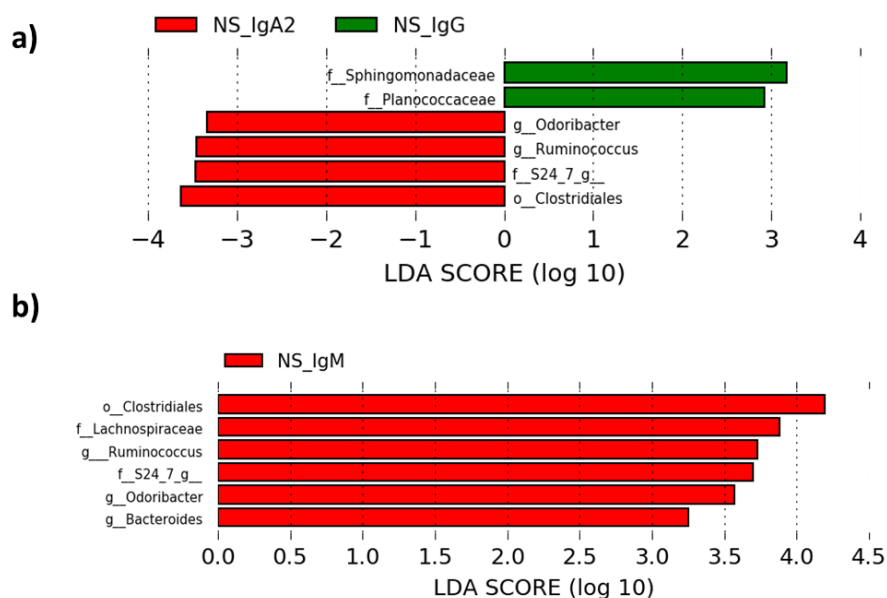


**Figura 19.** Diversidad Beta de las comunidades bacterianas en copro de neonatos. PCoA de grupos de bacterias unidas a las distintas inmunoglobulinas a) fracción IgA1+(naranja) b) IgA2+(azul), c) IgM+ (rosa claro), d) IgG+(verde) vs Comunidad total en rosa fuerte. En cada panel se muestran los valores de p y q, considerando valores < 0.05 como significativos.

## 9.10 Principales taxones prevalentes en muestras de copro de neonatos

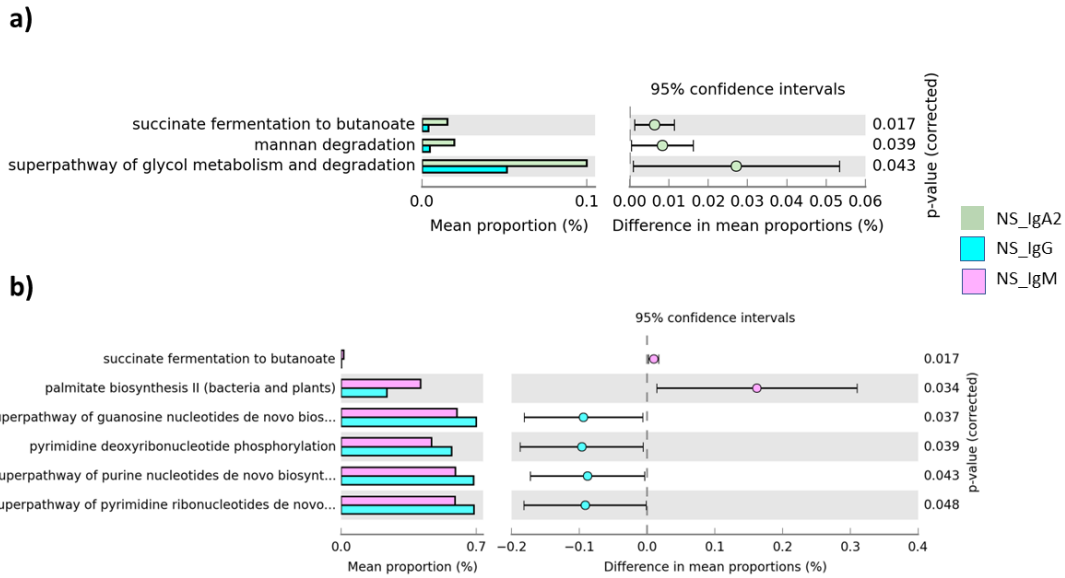
Posteriormente, se determinó el tamaño del efecto por análisis de discriminación lineal (LEfSe) para los diferentes taxones bacterianos en cada fracción de bacterias asociadas a las diferentes inmunoglobulinas en copro de neonatos alimentados con calostro. Cuando cada una de las fracciones bacterianas se comparó con la población total, múltiples grupos bacterianos se encontraron con una mayor abundancia en los grupos de bacterias recubiertas de inmunoglobulinas, encontrándose en todas las fracciones 12 taxones tales como: *Propionibacterium* y *Mycobacterium* (Actinobacteria), *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Firmicutes), *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Beijerinckia*, *Sphingopyx*s y las familias Phyllobacteriaceae y Xanthobacteriaceae (Proteobacteria), con mayor abundancia que el grupo de muestras totales. En el caso de bacterias del phylum Bacteroidetes se encontró preferencialmente fracciones IgA2+ e IgM+, con taxones como *Odoribacter*, S24\_7 (IgM+) y *Parabacteroides* (IgA1). Aunque en cada fracción se encontraron bacterias en particular (Tabla S1 Anexo 1).

Debido a la diferencia de Bacteroidetes entre el grupo IgG+ e IgA2, así como con IgM Se analizó una comparación de estos grupos, para ver que bacterias podrían ser las responsables de estas diferencias, encontrando a *Odoribacter*, la familia S24\_7 y *Bacteroidetes* (esta última solo en IgM) con una mayor abundancia tanto en IgA2 como en IgM en comparación con la fracción IgG+. Además, a la alta presencia de Bacteroidetes, también se encontraron Firmicutes de gran importancia como *Ruminococcus*, el orden Clostridiales y Lachnospiraceae (IgM+) (Figura 20).



**Figura 20.** Análisis LefSe entre bacterias IgG+, bacterias IgM+ e IgA2+ en muestras de copro de neonatos. a) Taxones diferenciales entre la fracción IgA2+ (rojo) y en la fracción IgG+ (verde) b) Bacterias enriquecidas en fracción IgM+ (rojo) comparada con IgG+ mostrados como barras horizontales que indican el tamaño del efecto. LDA score 2 de corte. o = orden; f = familia; g = género.

Para poder entender las características de las bacterias que fueron unidas por las inmunoglobulinas, de manera similar al análisis en muestras de calostro, se realizó el análisis de predicción metagenómica con las muestras de copro. Se encontraron mayores diferencias entre las bacterias IgG+ con las bacterias IgA2 e IgM. En estas últimas se observó vías relacionadas con: producción de butirato por la vía de fermentación de succinato (IgM e IgA2+), biosíntesis de palmitato en las fracciones IgM y degradación de manosa y glicol en IgA2+. En cambio, en la fracción IgG+ se presentaron vías relacionadas con la biosíntesis de nucleótidos (Figura 21).



**Figura 21.** Metagenoma predictivo en muestras de copro de neonatos por análisis PICRUST2.a) En fracciones bacterianas unidas a IgA2 (verde claro) se muestra la abundancia significativa de las vías metabólicas comparada IgG (azul turquesa) b) barras extendidas que muestran vías metabólicas en IgM (rosa claro) comparadas con IgG. Todos los valores se representan como media  $\pm$  DE. Los valores corregidos de  $p$  se muestran al costado derecho de la figura considerando  $p > 0.05$  como significativo.

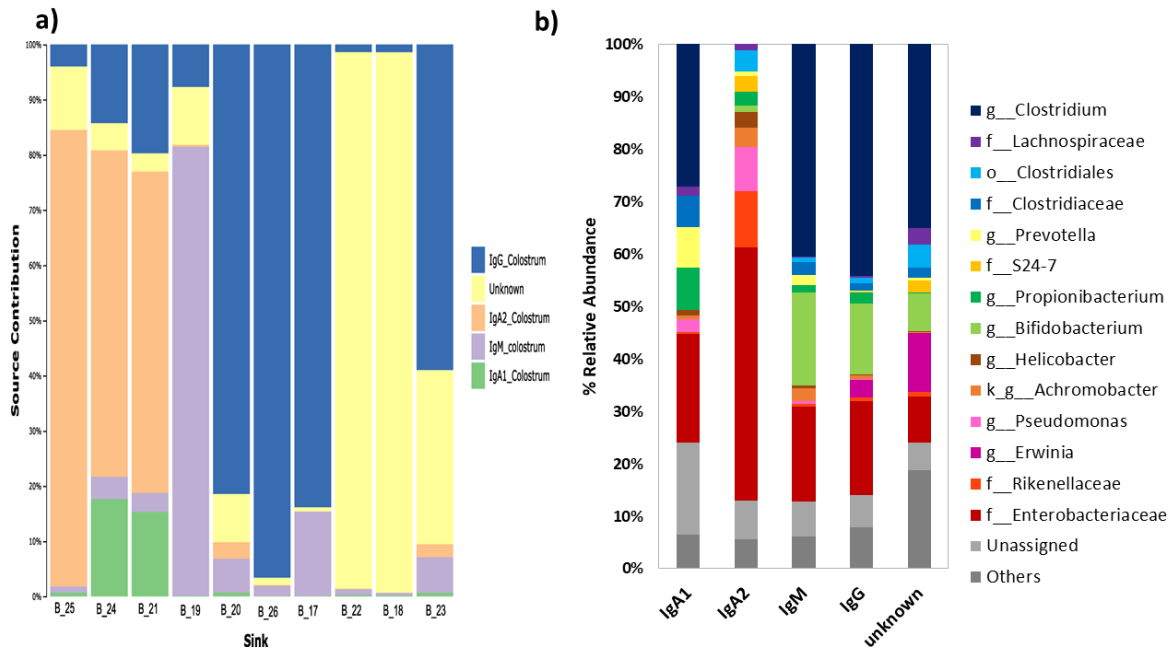
### 9.11 Relación de bacterias provenientes de calostro y la microbiota fecal de neonatos

Por último, para evaluar el impacto de las bacterias cubiertas con inmunoglobulinas del calostro en el intestino del infante, se realizó un análisis para predecir qué porcentaje de bacterias encontradas en el copro de los neonatos podrían provenir del calostro. Para este análisis se usó como fuente de bacterias, cada una de las fracciones de bacterias de calostro unidas a inmunoglobulinas y como recipiente (sink) las bacterias totales en el copro de 10 neonatos analizados por FACS. Los resultados se muestran como porcentaje de contribución de cada una de las fuentes a la comunidad total.

Como resultado observamos que la contribución de las inmunoglobulinas varía mucho entre los individuos, visualizándose 3 bebés con una alta contribución de bacterias IgA2+ e IgA1+, otro bebé con una alta contribución de IgM, y un clúster de 3 de bebés con una mayor contribución de IgG. Además, se observa que, en 3



bebés, una escasa contribución bacterias-Ig; siendo mayor la aportación bacteriana de otras fuentes no evaluadas en el trabajo (unknown) que las proporcionadas por el calostro (Figura 22).



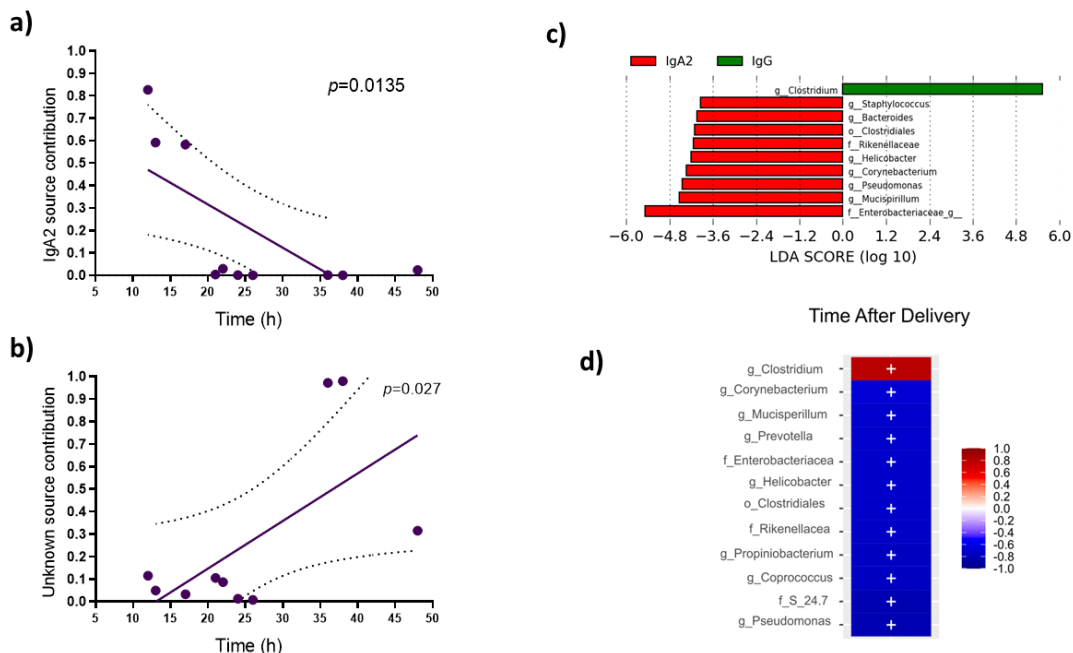
**Figura 22.** Análisis de fuentes bacterianas en el intestino neonatal por Source tracking. (a) Porcentaje de contribución de cada fuente (bacterias unidas a inmunoglobulinas de calostro) en cada neonato (copro) n = 10. Fracción IgG+ mostrado en azul, IgA2 salmón, IgM morado, IgA1 verde. (b) Abundancia relativa de bacterias en aportadas al intestino neonatal por cada fracción bacteriana de calostro unida a inmunoglobulina (mostradas como el promedio de los 10 neonatos). “Unknown” son otras fuentes bacterianas no evaluadas en el trabajo.

Así mismo se encontraron bacterias en el intestino de los neonatos cuya fuente fue aportada por las bacterias unidas a IgA2, 48.36%. IgA2 aportó principalmente la familia Enterobacteriaceae con un 48.36% y otras Proteobacteria como *Pseudomonas* y *Achromobacter* principalmente, además de Clostridiales (Firmicutes). En cuanto a las demás inmunoglobulinas IgG e IgM aportan principalmente *Clostridium* (44.14% -40.43%), *Bifidobacterium* (Actinobacteria) (13.54%-17.79%) y Enterobacterias (18.15%-17.92%). En cuanto a IgA1 también contribuye con el aporte de *Clostridium* y Enterobacteriaceae, adicionalmente proporciona *Propionibacterium* (Actinobacteria) (8%) y *Prevotella* (Bacteroidetes)

(7.72%). Mediante este análisis podemos apreciar el gran aporte de las bacterias recubiertas de inmunoglobulinas a el intestino del neonato (Figura 22b).

### 9.12 Correlación entre tiempo posparto con la abundancia de bacterias y el aporte bacteriano por inmunoglobulinas

Al observar la gran variabilidad del aporte de bacterias recubiertas con inmunoglobulinas maternas, se observó una tendencia en el porcentaje aportado con el tiempo posparto (Figura 23). Ante tal comportamiento observado se realizó un análisis de correlación para evaluar si el porcentaje de contribución cambiaba con el tiempo. Como resultado observamos una correlación negativa en la contribución de IgA2 y las horas posparto (Figura 23a), y una correlación positiva con la contribución de otras fuentes desconocidas o no evaluadas en el estudio (unknown) a la microbiota del neonato (Figura 23b).



**Figura 23.** Correlación del tiempo después del parto con bacterias y sus fuentes. (a) correlación de Pearson del tiempo posparto con el porcentaje de contribución de IgA2 a la microbiota neonatal calculado por source tracker. (b) Correlación de Pearson de fuentes desconocidas a lo largo del tiempo. (c) LefSe análisis para bacterias preferentemente contribuyentes al neonato en la fracción IgA2 de calostro e IgG+ calostro. f = familia; g = género (d) Correlación de Spearman de bacterias de copro con el tiempo posparto, las casillas en rojo representan correlaciones positivas y en azul las negativas. Se consideró un valor significativo de  $p = 0.05$  representado con el símbolo “+”.

Se compararon estadísticamente las bacterias encontradas en el neonato mayormente aportadas por cada inmunoglobulina encontrándose únicamente una diferencia entre las bacterias aportadas por IgA2+ e IgG. Observándose que IgG+ aporta significativamente mayor abundancia de *Clostridium* que IgA2+, en cambio IgA2 provee mayormente *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Bacteroidetes*, Rikenellaceae, *Staphylococcus* y Clostridiales (Figura 23c).

Las bacterias con mayor prevalencia a ser aportadas por IgA2, se encontraron también correlacionadas negativamente con el tiempo después del parto en el copro de los neonatos (Figura 23d). Eso sugiere que hay una tendencia de estas bacterias, a encontrarse en menor abundancia en los neonatos con más horas después de que nacieron. Con estos resultados mostramos un panorama general de la influencia de la selección bacteriana con inmunoglobulinas maternas en la comunidad bacteriana del recién nacido.

## 10 DISCUSION

Los datos presentados en este trabajo muestran que, las inmunoglobulinas maternas recubren una gran variedad de bacterias en calostro y en el intestino de los recién nacidos alimentados con este. De las inmunoglobulinas estudiadas, se observó la notoria participación de IgA2 e IgM en el recubrimiento de alfa y beta proteobacteria en calostro; mientras que, en el copro de neonatos preferencialmente participan en el recubrimiento de Bacteroidetes. Mediante el uso de anticuerpos secundarios específicos de isotipo, se mostró que existen inmunoglobulinas maternas reactivas a la microbiota del calostro humano en condiciones de homeostasis, y que estas inmunoglobulinas unen un amplio espectro de comensales en el intestino neonatal; lo cual puede tener un impacto en el establecimiento de la primera microbiota en el recién nacido.

Aunque existen múltiples trabajos que reportan comunidades bacterianas en la leche materna (Fernández *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2016), poco se conoce sobre la interacción de las bacterias encontradas en la leche materna y su relación con el hospedero. En este trabajo identificamos aquellos microorganismos en el calostro que fueron reconocidos por inmunoglobulinas materna, encontrando que no solo los subtipos de IgA (la inmunoglobulina más abundante en calostro) recubre comensales, si no también IgM e IgG, los cuales unieron un set de bacterias similar a IgA. Aunque cada isotipo tuvo preferencia por algunas bacterias en particular.

Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado, donde IgA al ser prominentemente secretada en mucosas, recubre bacterias comensales, ya sea en el intestino donde ha sido mayormente estudiada (Bunker & Bendelac, 2018) o en calostro (Meyer *et al.*, 2018; E. Sánchez-Salguero *et al.*, 2021). Así mismo, se ha visto la importancia de la participación del subtipo IgA2 en el recubrimiento de bacterias intestinales en los infantes (E. Sánchez-Salguero *et al.*, 2021; Sterlin *et al.*, 2020).

Con la finalidad de contextualizar nuestros resultados, es importante mencionar que la población estudiada pertenece a una localidad de un país en vías

de desarrollo. Esto es relevante debido a las diferencias reportadas en la composición de la leche materna con respecto a la ubicación geográfica y al tipo de comunidad (Kumar *et al.*, 2016).

En nuestros resultados observamos una gran cantidad de proteobacterias en el calostro, en especial de alfa y beta proteobacteria. Esto concuerda con lo reportado previamente en microbiota de leche materna proveniente de mujeres en países en vías de desarrollo o comunidades rurales de India, Etiopia y el sur de África (Lackey *et al.*, 2019; Vaidya *et al.*, 2017). Entre las Proteobacterias reportadas se encuentran *Rhizobium*, *Achromobacter* y bacterias pertenecientes a las familias Xanthomonadaceae y Sphingomonadaceae tales como *Shiphingomonas* y *Sphingobium*, esta última también se reportó con una alta abundancia (10.7%) en una comunidad indígena Maya de Guatemala, comunidad geográficamente relacionada a la población mexicana (Lopez Leyva *et al.*, 2021). Sin embargo, la presencia de estas bacterias no es comúnmente reportada como parte frecuente del “Core” microbiota de leche materna.

De la misma manera, muchas de estas alfa y beta proteobacteria se han detectado en tejido mamario sano, especialmente *Sphingomonas*. Siendo proteobacteria el phylum más abundante en este tejido; por lo que lo que es posible que estas bacterias del tejido mamario sean también una fuente bacteriana en la leche materna, sirviendo de inóculo para los bebés (Urbaniak *et al.*, 2014; Xuan *et al.*, 2014). Las proteobacterias, no solo se encontraron como parte de la microbiota del calostro, sino que fueron inmunológicamente relevantes al encontrarse enriquecidas en las fracciones bacterianas IgA2 e IgM+. En la literatura se ha reportado que, IgA es capaz de recubrir miembros de alphaproteobacterias (Sphingomonadales), betaproteobacterias (Burkholderiales) y gammaproteobacteria (Xanthomonadaceae) en intestino de voluntarios sanos. Estos taxones raros cubiertos con IgA juegan un papel importante como miembros activos de la microbiota humana, que interactúan constantemente con el sistema inmune estimulándolo (D’Auria *et al.*, 2013).

Proteobacteria también juega un papel importante en la generación de un repertorio de IgA en suero, el cual protege al hospedero contra bacterias letales y sepsis bacteriana. En especial *Burkholderia*, *Sphingomonas* provenientes del intestino delgado y recuperadas en copro fueron reconocidas por IgA de suero en modelo murino; lo cual sugiere que estas proteobacterias podrían estar induciendo respuestas locales y sistémicas que ayudan a la protección del hospedero (Wilmore *et al.*, 2018).

Por lo anterior, las bacterias cubiertas con el subtipo de IgA2 e IgM en el calostro podrían jugar un papel importante en la inmunidad de la madre al estimular es sistema inmune induciendo respuesta hacia ellas. De la misma manera podrían tener un rol importante en la inmunidad del neonato una vez que las consume a través de la leche materna. Las bacterias podrían inducir una respuesta mediante las estructuras de sus membranas o bien, mediante la producción de metabolitos. En el primer caso, se ha visto que los glicoesfingolípidos membranales de *Sphingomonas*, actúan como moléculas de señalización para modular la respuesta inmune en el intestino; además de estar implicadas en el mantenimiento sistémico de células iNKT. Todo esto para la contribución al mantenimiento de la homeostasis inmunológica del hospedero (Wei *et al.*, 2010).

Aunado a esto, la producción de metabolitos de la microbiota reconocida por inmunoglobulinas podría contribuir a la defensa del hospedero estimulando diversos mecanismos inmunes. Mediante predicción metabólica, en este trabajo observamos que las bacterias IgA2+ e IgM+ presentaban un elevado metabolismo de ácidos grasos de cadena larga, saturados e insaturados. Estos ácidos grasos y sus metabolitos afectan diferentes funciones inmunes, incluyendo la producción de IgA (Hosomi *et al.*, 2019). Por ejemplo, se ha reportado que tanto el ácido palmítico de manera directa, como los esfingolípidos (uno de sus metabolitos) incrementan la producción de IgA. Los esfingolípidos son producidos de manera endógena por algunos comensales a través de la enzima serin palmitoil transferasa, aumentando la diferenciación de células B a células IgA+ plasmática en placas de Peyer; también se ha documentado que mejoran la migración de estas a la lámina propia intestinal

(Hosomi *et al.*, 2019; Kunisawa *et al.*, 2007). Así mismo, *Burholderia* y *Xanthomonas* contienen enzimas que favorecen la elongación de ácidos grasos saturados, lo cual sugiere que estos grupos también sean parcialmente responsables de la producción de ácidos grasos de cadena larga como ácido palmítico (Caspi *et al.*, 2020; Lu & Tonge, 2010).

Otro mecanismo de contribución a la respuesta inmune por parte de las proteobacterias es la inducción de mecanismos antiinflamatorios. En bacterias IgA2+ e IgM+ una de las vías elevadas fué la síntesis de palmitoleato, el cual se he descrito como un ácido graso con propiedades antiinflamatorias. El mecanismo responsable es a través de la reducción de la producción de citocinas proinflamatorias que suprimen la proliferación de las células Th17 y Th1 (Passos *et al.*, 2016). El enriquecimiento de las vías metabólicas involucradas en la síntesis de lípidos, en especial de ácidos grasos de cadena larga en las bacterias IgA2 e IgM+(biosíntesis de palmitoleato, micolato y ácidos grasos insaturados), se ha observado predominantemente en ratones jóvenes en comparación con ratones viejos. Estas vías también predominaron en ratones viejos que recibieron trasplante fecal de ratones jóvenes, notando un incremento de algunas proteobacterias en los jóvenes (Parker *et al.*, 2022) .

Debido a lo anterior, uno de los mecanismos propuestos podría ser que las bacterias en el intestino materno como *Xanthomonas*, *Burholderia* y *Sphingomonas* induzcan la producción de células productoras de IgA y estas viajen a las glándulas mamarias donde secretan IgA a la leche materna. En la leche materna podrían estar uniéndose a habitantes del tejido mamario, como alfa y beta proteobacteria. Ya que en modelo de ratón se ha visto que distintas bacterias que cohabitan el tracto gastrointestinal materno inducen la secreción de IgA a la leche materna; esto a través de placas de Peyer, observándose una similitud en el repertorio de IgA de intestino delgado y de las glándulas mamarias (Usami *et al.*, 2021). Lo anterior sugiere que IgA materna promueve relaciones simbióticas con comensales benéficos en la progenie. Por lo tanto, es posible pensar que los anticuerpos del calostro reconocen bacterias que habitan el intestino materno, en especial en el

intestino delgado. Ya que el repertorio de bacterias reconocido en el calostro es similar a las bacterias encontradas en el intestino delgado (Kastl *et al.*, 2020).

Cabe mencionar que los frecuentemente reportados como parte del “core” microbiota de calostro, y primeros colonizadores neonatales: *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Propionibacterium*, tuvieron un pobre reconocimiento por IgA2 en el calostro; encontrándose predominantemente en la fracción total, ya sea sin recubrir o cubiertos por otras inmunoglobulinas. En cambio, IgG+ presentó un mayor reconocimiento por estos primeros colonizadores en comparación a IgA2; tal es el caso de *Lactobacillus* y *propionibacterium*. Estos anaerobios facultativos, mostraron un metabolismo mayormente relacionado con la degradación de carbohidratos, ya que son conocidos por ser microorganismos glucolíticos degradadores de lactosa, y glucosa, así como productores de lactato (Chassard *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2021).

En cuanto a la comunidad bacteriana inicial del intestino neonatal, a pesar de ser inestable debido a su rápida variación temporal, y a la influencia de distintos factores que contribuyen a su composición (Shin *et al.*, 2015), observamos 3 grupos bacterianos predominantes: Enterobacterias, *Clostridium* y *Bifidobacterium*. Estas bacterias se han reportado como taxones dominantes en la microbiota fecal de infantes en los primeros días (E. Sánchez-Salguero *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2021). Es preciso destacar, que al igual que en el calostro, proteobacteria es el phylum con mayor abundancia en el intestino de los recién nacidos en las primeras 48 h.

La alta frecuencia de proteobacteria puede atribuirse a las primitivas condiciones del ambiente intestinal, que consiste principalmente en una mayor concentración de oxígeno, y una alta cantidad de glicanos. Por esta razón, en los primeros días de vida, la microbiota es frecuentemente dominada por anaerobios facultativos, principalmente proteobacterias (Shin *et al.*, 2015). Estas bacterias son necesarias para el desarrollo de la microbiota inicial del recién nacido, ya que, entre sus múltiples funciones, se encuentra hacer un lugar habitable para la colonización de anaerobios estrictos consumiendo el oxígeno, alterando el pH, disminuyendo el potencial redox y generando metabolitos que servirán de sustrato para colonizadores tardíos. En múltiples trabajos se ha observado que gamma



proteobacterias como *Pseudomonas* y *Enterobacteria* se encuentran presentes principalmente en los primeros días disminuyendo progresivamente al pasar el tiempo (Adlerberth & Wold, 2009; Tanaka & Nakayama, 2017). A pesar de que su presencia en la microbiota inicial es necesaria, su persistencia es un indicador de una microbiota inmadura, por lo cual, su frecuencia debe ser controlada. La colonización persistente de gamma proteobacterias puede resultar en inflamación intestinal, incrementando así la susceptibilidad del neonato a daño intestinal (Mirpuri *et al.*, 2013).

La transición a una microbiota madura está regulada en parte por la IgA. Mirpuri y colaboradores mostraron en modelo de ratón que la IgA recubre enterobacterias en los primeros días; principalmente para limitar su expansión y así poder dar paso a la colonización progresiva por anaerobios de los phyla Firmicutes y Bacteroidetes. En nuestro trabajo observamos que el calostro aporta a la microbiota del neonato bacterias unidas a Inmunoglobulinas, en particular IgA2, encontramos que recubre principalmente a la familia Enterobacteriaceae, lo cual coincide con lo reportado por Janzon, quienes reportaron el alto recubrimiento de este taxa por IgA (Janzon *et al.*, 2019). Esto cual sugiere un control inmunológico sobre estos grupos bacterianos. Este resultado subraya la importancia de los anaerobios facultativos como *Enterobacteria* en la colonización del intestino neonatal; ya que que son vitales para preparar las condiciones intestinales. A su vez es sustancial la regulación de estos por medio de por IgA, lo cual permite la subsecuente colonización con anaerobios estrictos, cuya abundancia es alta en etapas posteriores. Por lo que la IgA es crucial para la maduración de la microbiota en los primeros días.(Robertson *et al.*, 2019; Shin *et al.*, 2015).

En las muestras de copro tomadas dentro de las primeras 48 h, se observó el recubrimiento de una gran diversidad de grupos bacterianos. Desde grupos abundantes hasta taxones poco representados, o con baja frecuencia en la microbiota total. Este resultado coincide con lo reportado por D´Auria, la cual esclarece que inmunoglobulinas como IgA se unen a bacterias subrepresentadas o en baja frecuencia en la microbiota intestinal. Estas bacterias, comúnmente no son

reportadas en muestras tomadas directamente de la materia fecal, ya que la mayoría de los trabajos de microbiota intestinal humana se basan en el análisis de muestras directas de copro (D'Auria *et al.*, 2013).

En cuanto a la participación de los subtipos de la IgA materna, observamos que tanto IgA1 e IgA2 están involucradas en el recubrimiento de la microbiota del recién nacido. El recubrimiento por IgA2 e IgA1 en los primeros 3-5 meses de vida, ha sido estudiado por el grupo de Sterling y colaboradores donde evaluaron el recubrimiento de la microbiota intestinal con inmunoglobulinas producidos por el propio infante. Observaron que ambos subtipos de IgA estuvieron involucrados en el recubrimiento de microbiota en los meses de vida, en cambio en nuestro trabajo se evaluó solo la influencia de los anticuerpos maternos provistos por medio del calostro (Sterlin *et al.*, 2020).

A diferencia de lo reportado por nuestro grupo de trabajo en muestras de neonatos después de 3 días posparto, en esta ocasión pudimos apreciar bacterias asociadas a IgA1 en el copro de los neonatos. Esto a pesar de encontrar una menor cantidad de IgA1 que de IgA2 libre en el intestino de los recién nacidos. La razón podría radicar en la diferencia entre los tiempos de procesamiento de la muestra y muestreo, ya que las muestras se analizaban consecutivamente a la colección de la muestra. Además, en este trabajo los neonatos muestreados tenían un menor tiempo posparto. Esto es importante, ya que la presencia de proteasas específicas para IgA1 (tiene una región de bisagra más amplia), y en conjunto con las condiciones del intestino pueden influenciar en la reducción del recubrimiento con IgA1. Se ha reportado que solo 20 minutos de exposición de las bacterias de calostro o de copro es suficiente para disminuir en un 40% la cantidad de IgA1 (E. Sánchez-Salguero *et al.*, 2021).

Los resultados sugieren que las respuestas anticomensales por parte de IgA2 e IgA1 se observan tan pronto al recibir el calostro después del nacimiento; observando que los blancos de estos subtipos de IgA son amplios. Además, existe un solapamiento de taxones recubiertos por ambos subtipos tanto en el calostro como el copro. Lo anterior también se observó en intestino delgado e intestino

grueso, que IgA1 e IgA2 comparten blancos (Sterlin *et al.*, 2020). A su vez, no solo se ha mostrado que los subtipos de IgA comparten blancos, también se ha reportado el recubrimiento por IgM de bacterias IgA1+ e IgA2+ en íleon y el lumen del colon como producto de una interacción por glicanos. Lo cual sugiere que el papel de IgM como un auxiliar de IgA en el recubrimiento de bacterias intestinales, y en anclaje de estas a mucus intestinal (Sterlin *et al.*, 2020).

Los resultados en las muestras estudiadas mostraron una alta variabilidad interindividual en los grupos bacterianos que presentaron unión por las inmunoglobulinas. Lo cual sugiere que los blancos preferenciales de las inmunoglobulinas dependen de la composición de la microbiota personal, más que de la filogenia microbiana (Bunker *et al.*, 2015; Sterlin *et al.*, 2020). Aunque los anticuerpos que reconocen a la microbiota, unen diferentes tipos de comensales, no significa que sean inespecíficos. Se ha documentado que, los anticuerpos anti-comensales son poli reactivos, pero presentan especificidad y contienen múltiples hipermutaciones. Ya sea que reconocen a las bacterias de manera específica mediante la región F(ab), o en menor frecuencia, a través de las regiones glicosiladas de en la región Fc. En el caso de inmunoglobulinas secretoras como IgA e IgM también reconocen bacterias mediante el componente “SC” secretor (Pabst & Slack, 2020; Sterlin *et al.*, 2020).

La IgG, recubrió en calostro y en copro un grupo muy diverso de bacterias, desde bacterias probióticas como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, hasta bacterias colonizadoras del intestino neonatal como *Propionibacterium* (estos últimos 2 reportados también como habitantes del intestino delgado) y otras bacterias que suelen habitar en criptas intestinales (Donaldson *et al.*, 2015). La unión mediante IgG podría ayudar a un correcto muestreo de bacterias por los receptores FcRn expresados en las células epiteliales, lo cual que no genera una respuesta inmune exacerbada hacia la microbiota comensal (Fadlallah *et al.*, 2019).

Mediante análisis bioinformático se predijo que estas bacterias junto con *Clostridium*, son aportadas por el calostro para formar parte de la microbiota del neonato. Esto coincide con lo reportado en modelo de ratón, donde se describe que

anticuerpos maternos IgG2b e IgG3 producidos por la vía T independiente, al ser transferidos en la leche materna eran responsables del recubrimiento de comensales intestinales en los primeros días. Este recubrimiento por IgG TI, evitaba que se generaran anticuerpos con la ayuda de células Th foliculares en los primeros días. De esta manera, la IgG regulaba la respuesta inmune hacia los microbios recién adquiridos (Koch *et al.*, 2016). Esto sugiere un gran dinamismo de la respuesta IgG anti-comensal y que, junto con la IgA materna, colaboran para unir comensales en los primeros días.

El grupo de bacterias reconocido por IgG presenta características metabólicas asociadas con una alta biosíntesis nucleótidos *de novo*; estas vías metabólicas ayudan a las bacterias a sobrevivir y competir con otras especies. Se ha visto que la biosíntesis de nucleótidos tiene un papel importante en la colonización de algunos patógenos, los cuales, requieren la presencia de genes de biosíntesis como *PyrB* y *PurC* para la colonización del tracto gastrointestinal murino. En modelos “germ-free” se observó una sobreexpresión de estos genes en la colonización (Goncheva *et al.*, 2022). Por lo que especulamos que IgG pudiera estar recubriendo bacterias con una gran capacidad de colonización, regulando su propagación en el intestino del recién nacido. De esta manera IgG podría limitar la interacción de estas bacterias con el epitelio intestinal y previniendo su traslocación a otros tejidos (Sanidad *et al.*, 2022).

Otra sugerencia sería también que la IgG está reconociendo bacterias con potencial patobionte. Esta inmunoglobulina ha sido vinculada con una alta biosíntesis de nucleótidos en mecanismos de patogénesis y virulencia (Goncheva *et al.*, 2022). La IgG evitaría la permanencia de los patobiontes en el intestino, dada su capacidad para inhibir la colonización y el anclaje de patógenos entéricos en la mucosa intestinal del recién nacido durante las etapas iniciales de la colonización (Zeng *et al.*, 2016). Ya que se ha visto que la IgG materna transferida a través de la lactancia al intestino neonatal vía FcRn inhibe la colonización de patógenos y el anclaje de estos a la mucosa y al epitelio intestinal (Sanidad *et al.*, 2022).

La IgG, al igual que la IgM un grupo parecido de bacterias que la IgA, este hecho se ha reportado previamente tanto en modelos de ratón como en humanos adultos sanos (Bourgonje *et al.*, 2022; Koch *et al.*, 2016). Se propone que, aunque la IgG una un grupo similar de bacterias al que la IgA, esta respuesta no sea redundante; siendo que la IgG regule respuestas a microbios traslocados, mientras que la IgA pudiera atrapar microbios en el lumen (Koch *et al.*, 2016).

En nuestros resultados se observaron también diferencias entre las bacterias unidas a las inmunoglobulinas. En muestras de copro el recubrimiento de IgG a muchos comensales anaerobios productores de butirato disminuyó en comparación con IgA2. Entre los grupos afectados se encontraron las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae, así como otras bacterias del phylum Bacteroidetes. Este mismo fenómeno se observó en intestino de adultos sanos y adultos con IBD, donde realizaron la separación de bacterias IgG+ mediante la técnica de MACS. En estos trabajos se observó una disminución de la respuesta de IgG contra comensales productores de butirato (*Roseburia* y *Faecalibacterium*). Estas bacterias confieren protección de la barrera intestinal y actividades antiinflamatorias (Bourgonje *et al.*, 2022). En el mismo trabajo reportan una baja respuesta de parte de la IgG contra *Bacteroides*, reglejado en baja abundancia relativa. De manera similar en nuestro trabajo, los neonatos mostraron una menor proporción de *Bacteroides* en la fracción IgG+ comparado con IgM. Esta baja respuesta de la IgG contra *Bacteroides* también se observó en fracciones IgG3+ de ratón, enriqueciéndose Bacteroidales en la fracción IgG3+IgA+ comparado con el grupo IgG+IgA- (Koch *et al.*, 2016).

El enriquecimiento de Bacteroidetes en las fracciones IgA2 e IgM y de otros Firmicutes productores de butirato (según lo mostrado por PICRUST), podría deberse a que estas inmunoglobulinas ayuden al establecimiento de estos microorganismos en el mucus intestinal. Magri reportó en muestras de íleon y colon, bacterias asociadas a mucus en intestino de individuos sanos, formando parte de estas Lachnospiraceae y Ruminococcaceae. Estas familias se encontraron enriquecidos en fracciones IgM+IgA+ en comparación con IgM-IgA-, así mismo IgM

mostró un elevado recubrimiento por Bacteroidetes al igual que en nuestros resultados, de muestras neonatales (Magri *et al.*, 2017).

De acuerdo con lo reportado con Magri, la IgM materna puede cooperar junto con IgA a implementar la retención de diversas bacterias en el mucus del intestino neonatal, incluyendo Firmicutes y Bacteroidetes. Estas bacterias pueden ofrecer beneficios al hospedero mediante la producción de metabolitos como ácidos grasos de cadena corta. Uno de estos es el butirato, el cual tiene funciones importantes en los primeros días, una de estas es la activación de macrófagos y células dendríticas para promover propiedades antiinflamatorias; esto resulta en la diferenciación de células T reguladoras y en la producción de IL-10 que suprimen inflamación (Connors *et al.*, 2018). Así también, el butirato puede ser una fuente de energía para los colonocitos entre otras cosas.

En resumidas cuentas, las inmunoglobulinas maternas proporcionadas por el calostro pueden jugar distintos roles en el proceso de colonización y homeostasis intestinal del intestino del recién nacido. El recubrimiento por la IgA2 y la IgM podrían estar ayudando a anclar algunos comensales al mucus, mientras que la IgG puede facilitar el reconocimiento de microbios intestinales que escapan el reconocimiento con IgA e IgM ayudando al establecimiento de la homeostasis en los primeros días

Este trabajo tiene algunas limitantes como, un reducido número de muestras, debido a las dificultades de reclutamiento de mujeres sanas durante el pico de infecciones por SARS-CoV2. Un número reducido de participantes pudieron cumplir con los criterios establecidos para el estudio, aun con esta limitante, se observaron tendencias interesantes en mujeres mexicanas y sus neonatos. Pensamos que aumentando el número de muestras se podrían observar de mejor manera los efectos de las inmunoglobulinas en la microbiota del calostro y en la microbiota intestinal de los neonatos. Otra limitante fue el corto tiempo que los infantes se alimentaron, ya que su estancia es breve en el hospital. Sería interesante poder observar la microbiota de los neonatos con un mayor tiempo después del parto, para así ver si la cantidad de inmunoglobulinas aportadas por la madre aumenta. Un aspecto restrictivo en el trabajo es la poca cantidad de muestra aportada por las

participantes ya que, una mayor cantidad de muestra nos permitiría obtener una mayor biomasa para analizar.

## **11 CONCLUSIÓN**

Las inmunoglobulinas maternas, recubren a un amplio espectro de comensales en el calostro, en particular la IgA2 y la IgM presentaron una unión en especial contra proteobacterias, principalmente alfa y beta proteobacterias que tienen una alta síntesis de lípidos, mismos que podrían estar implicados en la estimulación del sistema inmune a través de la producción de la IgA. Así mismo la IgG une en el calostro a comensales que son importantes en la colonización del intestino neonatal en los primeros días, posiblemente para regular su diseminación en el intestino. De igual manera pudimos detectar bacterias recubiertas por los subtipos de IgA (IgA1 e IgA2) en el copro de los neonatos alimentados con lactancia materna exclusiva, encontrando que ambos tienen unen un grupo similar de bacterias. Pero es la IgA2 y la IgM quienes unen bacterias productoras de butirato, posiblemente para ayudarlas a establecerse en el colon del neonato. La IgG, por su parte, podría cubrir comensales para desalentar o desfavorecer su asociación al epitelio intestinal, inhibiendo la colonización de patógenos y su anclaje a la mucosa.

## **12 PERSPECTIVAS**

Como perspectivas del trabajo queda ir más allá de la identificación bacteriana de las comunidades y poder explorar otros aspectos funcionales y estructurales de las bacterias, a través de métodos como metaboloma, proteoma o transcriptoma, para responder que características funcionales expresan las bacterias que son blanco del sistema inmune a través de su unión con inmunoglobulinas y compararlas con las bacterias que no son reconocidas.

## 13 BIBLIOGRAFÍA

- Adlerberth, I., & Wold, A. E. (2009). Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, *98*(2), 229–238. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x>
- Atyeo, C., & Alter, G. (2021). The multifaceted roles of breast milk antibodies. *Cell*, *184*(6), 1486–1499. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.031>
- Baldassarre, M. E., Bellantuono, L., Mastromarino, P., Miccheli, A., Fanelli, M., & Laforgia, N. (2014). Gut and Breast Milk Microbiota and Their Role in the Development of the Immune Function. *Current Pediatrics Reports*, *2*(3), 218–226. <https://doi.org/10.1007/s40124-014-0051-y>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, *60*(1), 49–74. <https://doi.org/10.1016/J.PCL.2012.10.002>
- Barton, G. M., & Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, *300*(5625), 1524–1525. <https://doi.org/10.1126/science.1085536>
- Belkaid, Y., & Harrison, O. J. (2017). Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity*, *46*(4), 562–576. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008>
- Bourgonje, A. R., Roo-Brand, G., Lisotto, P., Sadaghian Sadabad, M., Reitsema, R. D., de Goffau, M. C., Faber, K. N., Dijkstra, G., & Harmsen, H. J. M. (2022). Patients With Inflammatory Bowel Disease Show IgG Immune Responses Towards Specific Intestinal Bacterial Genera. *Frontiers in Immunology*, *13*(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.842911>
- Bunker, J. J., & Bendelac, A. (2018). IgA Responses to Microbiota. *Immunity*, *49*(2), 211–224. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.011>
- Bunker, J. J., Erickson, S. A., Flynn, T. M., Henry, C., Koval, J. C., Meisel, M., Jabri, B., Antonopoulos, D. A., Wilson, P. C., & Bendelac, A. (2017). *Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota*. 6619. <https://doi.org/10.1126/science.aan6619>
- Bunker, J. J., Flynn, T. M., Koval, J. C., Shaw, D. G., Meisel, M., McDonald, B. D., Ishizuka, I. E., Dent, A. L., Wilson, P. C., Jabri, B., Antonopoulos, D. A., & Bendelac, A. (2015). Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity*, *43*(3), 541–553. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.007>
- Cabrera-Rubio, R., Mira-Pascual, L., Mira, A., & Collado, M. C. (2016). Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, *7*(1), 54–60. <https://doi.org/10.1017/S2040174415001397>



- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cao, Q., Sun, X., Rajesh, K., Chalasani, N., Gelow, K., Katz, B., Shah, V. H., Sanyal, A. J., & Smirnova, E. (2021). Effects of Rare Microbiome Taxa Filtering on Statistical Analysis. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 607325. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.607325/FULL>
- Caspi, R., Billington, R., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Ong, W. K., Paley, S., Subhraveti, P., & Karp, P. D. (2020). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D455–D453. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ862>
- Chassard, C., de Wouters, T., & Lacroix, C. (2014). Probiotics tailored to the infant: A window of opportunity. *Current Opinion in Biotechnology*, *26*, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.012>
- Chávez-Carbajal, A., Nirmalkar, K., Pérez-Lizaur, A., Hernández-Quiroz, F., Ramírez-del-Alto, S., García-Mena, J., & Hernández-Guerrero, C. (2019). Gut Microbiota and Predicted Metabolic Pathways in a Sample of Mexican Women Affected by Obesity and Obesity Plus Metabolic Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(2), 438. <https://doi.org/10.3390/ijms20020438>
- Chen, K., Magri, G., Grasset, E. K., & Cerutti, A. (2020). Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. *Nature Reviews Immunology*, *20*(7), 427–441. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0261-1>
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell*, *148*(6), 1258–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
- Connors, J., Dawe, N., & Van Limbergen, J. (2018). The Role of Succinate in the Regulation of Intestinal Inflammation. *Nutrients*, *11*(1), 25. <https://doi.org/10.3390/nu11010025>
- Corona-Cervantes, K., García-González, I., Villalobos-Flores, L. E., Hernández-Quiroz, F., Piña-Escobedo, A., Hoyo-Vadillo, C., Rangel-Calvillo, M. N., & García-Mena, J. (2020). Human milk microbiota associated with early colonization of the neonatal gut in Mexican newborns. *PeerJ*, *8*, e9205. <https://doi.org/10.7717/peerj.9205>
- D'Auria, G., Peris-Bondia, F., Džunková, M., Mira, A., Collado, M. C., Latorre, A., & Moya, A. (2013). Active and secreted IgA-coated bacterial fractions from the human gut reveal an under-represented microbiota core. *Scientific Reports*, *3*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep03515>
- Ding, M., Yang, B., Ross, R. P., Stanton, C., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2021). Crosstalk between sIgA-Coated Bacteria in Infant Gut and Early-Life Health. *Trends in Microbiology*, *29*(8), 725–735. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.012>

- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2015). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(1), 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, *38*(6), 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Duale, A., Singh, P., & Al Khodor, S. (2022a). Breast Milk: A Meal Worth Having. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 1270. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.800927/XML/NLM>
- Duale, A., Singh, P., & Al Khodor, S. (2022b). Breast Milk: A Meal Worth Having. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 1270. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.800927/XML/NLM>
- Eckmann, L., & Stappenbeck, T. S. (2015). IgG “detoxes” the intestinal mucosa. *Cell Host and Microbe*, *17*(5), 538–539. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.001>
- Fadlallah, J., El Kafsi, H., Sterlin, D., Juste, C., Parizot, C., Dorgham, K., Autaa, G., Gouas, D., Almeida, M., Lepage, P., Pons, N., Le Chatelier, E., Levenez, F., Kennedy, S., Galleron, N., De Barros, J. P. P., Malphettes, M., Galicier, L., Boutboul, D., ... Gorochov, G. (2018). Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency. *Science Translational Medicine*, *10*(439). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan1217>
- Fadlallah, J., Sterlin, D., Fieschi, C., Parizot, C., Dorgham, K., El Kafsi, H., Autaa, G., Ghillani-Dalbin, P., Juste, C., Lepage, P., Malphettes, M., Galicier, L., Boutboul, D., Clément, K., André, S., Marquet, F., Tresallet, C., Mathian, A., Miyara, M., ... Gorochov, G. (2019). Synergistic convergence of microbiota-specific systemic IgG and secretory IgA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *143*(4), 1575-1585.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.036>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.001>
- Fitzstevens, J. L., Smith, K. C., Hagadorn, J. I., Caimano, M. J., Matson, A. P., & Brownell, E. A. (2017). Systematic review of the human milk microbiota. *Nutrition in Clinical Practice*, *32*(3), 354–364. <https://doi.org/10.1177/0884533616670150>
- Fujihashi, K., Boyaka, P. N., & McGhee, J. R. (2012). Host defenses at mucosal surfaces. In *Clinical Immunology: Principles and Practice: Fourth Edition* (Fifth Edit). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7234-3691-1.00040-4>
- García-Mena, J., Murugesan, S., Pérez-Muñoz, A. A., García-Espitia, M., Maya, O., Jacinto-Montiel, M., Monsalvo-Ponce, G., Piña-Escobedo, A., Domínguez-Malfavón, L., Gómez-Ramírez, M., Cervantes-González, E., & Núñez-Cardona, M. T. (2016). Airborne Bacterial Diversity from the Low Atmosphere of Greater Mexico City. *Microbial Ecology*, *72*(1), 70–84. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0747-3>

- Gomez-Gallego, C., Garcia-Mantrana, I., Salminen, S., & Collado, M. C. (2016). The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 21(6), 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2016.05.003>
- Goncheva, M. I., Chin, D., & Heinrichs, D. E. (2022). Nucleotide biosynthesis: the base of bacterial pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 30(8), 793–804. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.12.007>
- Gopalakrishna, K. P., Macadangdang, B. R., Rogers, M. B., Tometich, J. T., Firek, B. A., Baker, R., Ji, J., Burr, A. H. P., Ma, C., Good, M., Morowitz, M. J., & Hand, T. W. (2019). Maternal IgA protects against the development of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Nature Medicine*, 25(7), 1110–1115. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0480-9>
- Hosomi, K., Kiyono, H., & Kunisawa, J. (2019). Fatty acid metabolism in the host and commensal bacteria for the control of intestinal immune responses and diseases. *Https://Doi.Org/10.1080/19490976.2019.1612662*, 11(3), 276–284. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1612662>
- Hunt, K. M., Preuss, J., Nissan, C., Davlin, C. A., Williams, J. E., Shafii, B., Richardson, A. D., McGuire, M. K., Bode, L., & McGuire, M. A. (2012). Human Milk Oligosaccharides Promote the Growth of Staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4763–4770. <https://doi.org/10.1128/aem.00477-12>
- Hurley, W. L., & Theil, P. K. (2011). Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*, 3(4), 442–474. <https://doi.org/10.3390/nu3040442>
- Hurley, W. L., & Theil, P. K. (2013). Immunoglobulins in Mammary Secretions. In *Advanced Dairy Chemistry* (Vol. 1, pp. 275–294). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_9)
- Janzon, A., Goodrich, J. K., Koren, O., Waters, J. L., & Ley, R. E. (2019). Interactions between the Gut Microbiome and Mucosal Immunoglobulins A, M, and G in the Developing Infant Gut. *MSystems*, 4(6), 14. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00612-19>
- Jeurink, P. V., van Berghenhenegouwen, J., Jiménez, E., Knippels, L. M. J., Fernández, L., Garssen, J., Knol, J., Rodríguez, J. M., & Martín, R. (2012). Human milk: a source of more life than we imagine. *Http://Dx.Doi.Org/10.3920/BM2012.0040*, 4(1), 17–30. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0040>
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., & Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *British Journal of Nutrition*, 110(7), 1253–1262. <https://doi.org/10.1017/S0007114513000597>
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., & Chassard, C. (2015). Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutrition Reviews*, 73(7), 426–437. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu016>

- 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. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12238>
- Kalbermatter, C., Fernandez Trigo, N., Christensen, S., & Ganai-Vonarburg, S. C. (2021). Maternal Microbiota, Early Life Colonization and Breast Milk Drive Immune Development in the Newborn. *Frontiers in Immunology*, *12*(May), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.683022>
- Kastl, A. J., Terry, N. A., Wu, G. D., & Albenberg, L. G. (2020). The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. *Cmgh*, *9*(1), 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.07.006>
- Kirkland, D., Benson, A., Mirpuri, J., Pifer, R., Hou, B., DeFranco, A. L., & Yarovinsky, F. (2012). B Cell-Intrinsic MyD88 Signaling Prevents the Lethal Dissemination of Commensal Bacteria during Colonic Damage. *Immunity*, *36*(2), 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.11.019>
- Knights, D., Kuczynski, J., Charlson, E. S., Zaneveld, J., Mozer, M. C., Collman, R. G., Bushman, F. D., Knight, R., & Kelley, S. T. (2011). Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nature Methods*, *8*(9), 761–765. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1650>
- Koch, M. A., Reiner, G. L., Lugo, K. A., Kreuk, L. S. M., Stanbery, A. G., Ansaldo, E., Seher, T. D., Ludington, W. B., & Barton, G. M. (2016). Maternal IgG and IgA Antibodies Dampen Mucosal T Helper Cell Responses in Early Life. *Cell*, *165*(4), 827–841. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.055>
- Kubinak, J. L., & Round, J. L. (2016). Do antibodies select a healthy microbiota? *Nature Reviews Immunology*, *16*(12), 767–774. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.114>
- Kumar, H., du Toit, E., Kulkarni, A., Aakko, J., Linderborg, K. M., Zhang, Y., Nicol, M. P., Isolauri, E., Yang, B., Collado, M. C., & Salminen, S. (2016). Distinct patterns in human milk microbiota and fatty acid profiles across specific geographic locations. *Frontiers in Microbiology*, *7*(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01619>
- Kunisawa, J., Kurashima, Y., Gohda, M., Higuchi, M., Ishikawa, I., Miura, F., Ogahara, I., & Kiyono, H. (2007). Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B-cell trafficking for subsequent intestinal IgA production. *Blood*, *109*(9), 3749–3756. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-08-041582>
- Lackey, K. A., Williams, J. E., Meehan, C. L., Zachek, J. A., Benda, E. D., Price, W. J., Foster, J. A., Sellen, D. W., Kamau-Mbuthia, E. W., Kamundia, E. W., Mbugua, S., Moore, S. E., Prentice, A. M., K, D. G., Kvist, L. J., Otoo, G. E., García-Carral, C., Jiménez, E., Ruiz, L., ... McGuire, M. K. (2019). What's Normal? Microbiomes In Human Milk And Infant Feces Are Related To Each Other But Vary Geographically: The INSPIRE Study. *Frontiers in Nutrition*, *6*(April), 45. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2019.00045>

- Laursen, M. F., Bahl, M. I., & Licht, T. R. (2021). Settlers of our inner surface-factors shaping the gut microbiota from birth to toddlerhood. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(4), 1–14. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab001>
- León, E. D., & Francino, M. P. (2022). Roles of Secretory Immunoglobulin A in Host-Microbiota Interactions in the Gut Ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 13(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.880484>
- Lopez Leyva, L., Gonzalez, E., Li, C., Ajeeb, T., Solomons, N. W., Agellon, L. B., Scott, M. E., & Koski, K. G. (2021). Human Milk Microbiota in an Indigenous Population Is Associated with Maternal Factors, Stage of Lactation, and Breastfeeding Practices. *Current Developments in Nutrition*, 5(4), 1–15. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzab013>
- Lu, H., & Tonge, P. J. (2010). Mechanism and inhibition of the FabV enoyl-ACP reductase from *Burkholderia mallei*. *Biochemistry*, 49(6), 1281–1289. <https://doi.org/10.1021/BI902001A>
- MacPherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F. E., & Brandtzaeg, P. (2007). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology* 2008 1:1, 1(1), 11–22. <https://doi.org/10.1038/mi.2007.6>
- Magri, G., Comerma, L., Pybus, M., Sintes, J., Lligé, D., Segura-Garzón, D., Bascones, S., Yeste, A., Grasset, E. K., Gutzeit, C., Uzzan, M., Ramanujam, M., van Zelm, M. C., Albero-González, R., Vazquez, I., Iglesias, M., Serrano, S., Márquez, L., Mercade, E., ... Cerutti, A. (2017). Human Secretory IgM Emerges from Plasma Cells Clonally Related to Gut Memory B Cells and Targets Highly Diverse Commensals. *Immunity*, 47(1), 118-134.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.013>
- Mcdonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., Desantis, T. Z., Probst, A., Andersen, G. L., Knight, R., & Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal*, 6, 610–618. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Meyer, K. M., Prince, A., Boggan, B., & Aagaard, K. (2018). Maternal IgA targets distinct communities of bacteria in the breast milk, maternal gut, and infant gut microbiomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 218(1), S371–S372. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.11.962>
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(4), 1–67. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>

- Mirpuri, J., Raetz, M., Sturge, C. R., Wilhelm, C. L., Benson, A., Savani, R. C., Hooper, L. V., & Yarovinsky, F. (2013). Proteobacteria-specific IgA regulates maturation of the intestinal microbiota. *Gut Microbes*, *5*(1). <https://doi.org/10.4161/gmic.26489>
- Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G. M., Altaye, M., Jiang, X., Lourdes Guerrero, M., Meinen-Derr, J. K., Farkas, T., Chaturvedi, P., Pickering, L. K., & Newburg, D. S. (2004). Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *The Journal of Pediatrics*, *145*(3), 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.04.054>
- Notarbartolo, V., Giuffre, M., Montante, C., Corsello, G., & Carta, M. (2022). Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*, *25*(3), 194–210. <https://doi.org/10.5223/pghn.2022.25.3.194>
- Ogra, P. L., Walker, W. A., & Lönnerdal, B. (2020). Preface. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, *94*, VI–VIII. <https://doi.org/10.1159/000505372>
- Osorio, L. M., & Umbarila, A. S. (2015). Microbiota de la glándula mamaria. *Pediatría*, *48*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.rcpe.2015.07.001>
- Pabst, O., & Slack, E. (2020). IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. In *Mucosal Immunology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 12–21). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0227-4>
- Parker, A., Romano, S., Ansoerge, R., Aboelnour, A., Le Gall, G., Savva, G. M., Pontifex, M. G., Telatin, A., Baker, D., Jones, E., Vauzour, D., Rudder, S., Blackshaw, L. A., Jeffery, G., & Carding, S. R. (2022). Fecal microbiota transfer between young and aged mice reverses hallmarks of the aging gut, eye, and brain. *Microbiome* *2022* *10:1*, *10*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/S40168-022-01243-W>
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, *30*(21), 3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Passos, M. E. P., Alves, H. H. O., Momesso, C. M., Faria, F. G., Murata, G., Cury-Boaventura, M. F., Hatanaka, E., Massao-Hirabara, S., & Gorjão, R. (2016). Differential effects of palmitoleic acid on human lymphocyte proliferation and function. *Lipids in Health and Disease*, *15*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12944-016-0385-2/FIGURES/7>
- Perez, P. F., Dore, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E. J., & Donnet-Hughes, A. (2007). Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells? *PEDIATRICS*, *119*(3), e724–e732. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1649>
- Ramiro-Cortijo, D., Singh, P., Liu, Y., Medina-Morales, E., Yakah, W., Freedman, S. D., & Martin, C. R. (2020). Breast Milk Lipids and Fatty Acids in Regulating Neonatal Intestinal Development and Protecting against Intestinal Injury. *Nutrients*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/NU12020534>

- Rautava, S. (2020). Milk Microbiome and Neonatal Colonization: Overview. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 94, 65–74. <https://doi.org/10.1159/000505030>
- Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S., & Isolauri, E. (2012). Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9(10), 565–576. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.144>
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2(4), 361–367. <https://doi.org/10.1038/86373>
- Rio-aige, K., Azagra-boronat, I., Castell, M., Selma-royo, M., Rodr, J., & Francisco, J. P. (2021). *The Breast Milk Immunoglobulinome*.
- Robertson, R. C., Manges, A. R., Finlay, B. B., & Prendergast, A. J. (2019). The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. *Trends in Microbiology*, 27(2), 131–147. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.09.008>
- Ruiz, L., Bacigalupe, R., García-Carral, C., Boix-Amoros, A., Argüello, H., Silva, C. B., de los Angeles Checa, M., Mira, A., & Rodríguez, J. M. (2019). Microbiota of human precolostrum and its potential role as a source of bacteria to the infant mouth. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42514-1>
- Sánchez-Salguero, E., Corona-Cervantes, K., Guzmán-Aquino, H. A., de la Borbolla-Cruz, M. F., Contreras-Vargas, V., Piña-Escobedo, A., García-Mena, J., & Santos-Argumedo, L. (2021). Maternal IgA2 Recognizes Similar Fractions of Colostrum and Fecal Neonatal Microbiota. *Frontiers in Immunology*, 12(November), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.712130>
- Sánchez-Salguero, E., Mondragón-Ramírez, G. K., Alcántara-Montiel, J. C., Cébulo-Vázquez, A., Villegas-Domínguez, X., Contreras-Vargas, V. M., Thompson-Bonilla, M. del R., Romero-Ramírez, H., & Santos-Argumedo, L. (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(1), 9–16. <https://doi.org/10.1186/s40748-019-0104-x>
- Sánchez-Salguero, E. S., & Santos-Argumedo, L. (2018). La asociación de la microbiota humana con la inmunoglobulina A y su participación en la respuesta inmunológica. *Revista Alergia México*, 65(3), 184. <https://doi.org/10.29262/ram.v65i3.519>
- Sanidad, K. Z., Amir, M., Ananthanarayanan, A., Singaraju, A., Shiland, N. B., Hong, H. S., Kamada, N., Inohara, N., Núñez, G., & Zeng, M. Y. (2022). *Maternal gut microbiome – induced IgG regulates neonatal gut microbiome and immunity*. 3816(June), 1–12.
- Scientific, T. F. (2022). *Immunoglobulin Structure and Classes*. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/immunoglobulin-structure-classes.html>

- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Selma-Royo, M., Calvo-Lerma, J., Bäuerl, C., Esteban-Torres, M., Cabrera-Rubio, R., & Collado, M. C. (2022). Human milk microbiota: what did we learn in the last 20 years? *Microbiome Research Reports*, 1(3), 19. <https://doi.org/10.20517/mrr.2022.05>
- Shin, N. R., Whon, T. W., & Bae, J. W. (2015). Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 33(9), 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
- Soto, R., & Round, J. (2016). Immunology: You Remind Me of a Microbe i Know. *Current Biology*, 26(9), R373–R376. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.064>
- Sterlin, D., Fadlallah, J., Adams, O., Fieschi, C., Parizot, C., Dorgham, K., Rajkumar, A., Autaa, G., El-Kafsi, H., Charuel, J. L., Juste, C., Jönsson, F., Candela, T., Wardemann, H., Aubry, A., Capito, C., Brisson, H., Tresallet, C., Cummings, R. D., ... Gorochov, G. (2020). Human IgA binds a diverse array of commensal bacteria. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(3). <https://doi.org/10.1084/jem.20181635>
- Tamburini, S., Shen, N., Wu, H. C., & Clemente, J. C. (2016). The microbiome in early life: Implications for health outcomes. *Nature Medicine*, 22(7), 713–722. <https://doi.org/10.1038/nm.4142>
- Tanaka, M., & Nakayama, J. (2017). Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergology International*, 66(4), 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.07.010>
- Urbaniak, C., Cummins, J., Brackstone, M., Macklaim, J. M., Gloor, G. B., Baban, C. K., Scott, L., O'Hanlon, D. M., Burton, J. P., Francis, K. P., Tangney, M., & Reid, G. (2014). Microbiota of Human Breast Tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3007–3014. <https://doi.org/10.1128/aem.00242-14>
- Usami, K., Niimi, K., Matsuo, A., Suyama, Y., Sakai, Y., Sato, S., Fujihashi, K., Kiyono, H., Uchino, S., Furukawa, M., Islam, J., Ito, K., Moriya, T., Kusumoto, Y., Tomura, M., Hovey, R. C., Sugawara, J., Yoneyama, H., Kitazawa, H., ... Nochi, T. (2021). The gut microbiota induces Peyer's-patch-dependent secretion of maternal IgA into milk. *Cell Reports*, 36(10), 109655. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109655>
- Vaidya, Y. H., Patel, S. H., Patel, R. J., Pandit, R. J., Joshi, C. G., & Kunjadia, A. P. (2017). Human milk microbiome in urban and rural populations of India. *Meta Gene*, 13(April), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2017.04.001>
- Van Der Waaij, L. A., Limburg, P. C., Mesander, G., & Van Der Waaij, D. (1996). In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut*, 38(3), 348–354. <https://doi.org/10.1136/gut.38.3.348>
- Verhasselt, V. (2010). Neonatal tolerance under breastfeeding influence. *Current Opinion in Immunology*, 22(5), 623–630. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.08.008>



- Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2007). 'Yin-Yang' functions of TGF- $\beta$  and Tregs in immune regulation. *Immunological Reviews*, 220(1), 199. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2007.00565.X>
- Wei, B., Wingender, G., Fujiwara, D., Chen, D. Y., McPherson, M., Brewer, S., Borneman, J., Kronenberg, M., & Braun, J. (2010). Commensal Microbiota and CD8+ T Cells Shape the Formation of Invariant NKT Cells. *The Journal of Immunology*, 184(3), 1218–1226. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0902620>
- Wilmore, J. R., Gaudette, B. T., Gomez Atria, D., Hashemi, T., Jones, D. D., Gardner, C. A., Cole, S. D., Mistic, A. M., Beiting, D. P., & Allman, D. (2018). Commensal Microbes Induce Serum IgA Responses that Protect against Polymicrobial Sepsis. *Cell Host and Microbe*, 23(3), 302-311.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.005>
- Xuan, C., Shamonki, J. M., Chung, A., DiNome, M. L., Chung, M., Sieling, P. A., & Lee, D. J. (2014). Microbial Dysbiosis Is Associated with Human Breast Cancer. *PLoS ONE*, 9(1), 83744. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0083744>
- Yao, Y., Cai, X., Ye, Y., Wang, F., Chen, F., & Zheng, C. (2021). The Role of Microbiota in Infant Health: From Early Life to Adulthood. *Frontiers in Immunology*, 12(October), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708472>
- Yoshida, M., & Wayne I. Lencer, R. S. B. (2006). Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. *Journal of Clinical Investigation*, 116(8), 2142–2151. <https://doi.org/10.1172/JCI27821>
- Zeng, M. Y., Cisalpino, D., Varadarajan, S., Hellman, J., Warren, H. S., Cascalho, M., Inohara, N., & Núñez, G. (2016). Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. *Immunity*, 44(3), 647–658. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.006>
- Zeng, M. Y., Cisalpino, D., Varadarajan, S., Hellman, J., Warren, S., Cascalho, M., Inohara, N., & Núñez, G. (2017). *Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens*. 44(3), 647–658. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.006.Gut>
- Zhuang, L., Chen, H., Zhang, S., Zhuang, J., Li, Q., & Feng, Z. (2019). Intestinal Microbiota in Early Life and Its Implications on Childhood Health. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 17(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.10.002>

## 14 ANEXOS

### ANEXO1

**14.1 Tabla S1** Taxones diferenciales unidos a Inmunoglobulinas en Copro de neonatos

Phylum	Bacteria	Grupo /inmunoglobulina	LDA	p
Actinobacteria	<i>g__Propionibacterium</i>	NS_IgA1	4.5763004	0.00407199
		NS_IgA2	4.77182595	0.00328861
		NS_IgM	4.67483835	0.0031971
		NS_IgG	4.76816888	0.00705073
	<i>g__Corynebacterium</i>	NS_IgA2	4.48222051	0.00323885
		NS_IgM	3.6470856	0.00060906
		NS_IgG	3.7523682	0.00509816
	<i>g__Kocuria</i>	NS_IgA2	3.69434609	0.00096079
		NS_IgM	3.20018938	0.03057046
		NS_IgG	3.32287731	0.00845578
	<i>f__Nocardioideaceae</i>	NS_IgG	3.53178298	0.00574115
	<i>g__Microbacterium</i>	NS_IgA1	3.09794898	0.01300205
	<i>g__Micrococcus</i>	NS_IgG	3.63601622	0.00411279
	<i>g__Microbispora</i>	NS_IgG	3.47210828	0.02205578
	<i>g__Brevibacterium</i>	NS_IgA1	3.20126286	0.03057046
		NS_IgM	3.04060967	0.01300205
	<i>g__Rhodococcus</i>	NS_IgA1	3.11400812	0.01300205
	<i>f__Dermabacteraceae</i>	NS_IgA2	3.67402874	0.02205578
<i>g__Mucispirillum</i>	NS_TOTAL	3.8052607	0.01778922	
<i>g__Mycobacterium</i>	NS_IgA1	3.3210668	0.01895927	
	NS_IgA2	3.97407865	0.03379057	
	NS_IgM	3.15855455	0.01503014	
	NS_IgG	3.35552527	0.01093087	
Firmicutes	<i>g__Lactobacillus</i>	NS_IgA1	3.64199458	0.00154183
		NS_IgA2	3.84722084	0.00854141
		NS_IgM	3.7227423	0.0062669
		NS_IgG	3.80549442	0.01753095
	<i>g__Staphylococcus</i>	NS_IgA1	4.09487983	0.04434814
		NS_IgA2	3.7724886	0.01122575
		NS_IgM	3.68806173	0.0100521
	<i>g__Streptococcus</i>	NS_IgA1	3.71409497	0.02901248
		NS_IgA2	3.83941958	0.01066038
		NS_IgM	3.7478831	0.00179092
		NS_IgG	3.96047149	0.02256926

	<i>g__Veillonella</i>	NS_IgA1	3.43949696	0.03057046
	f__Clostridiaceae	NS_TOTAL	3.85503834	0.03144562
Bacteroidetes	<i>g__Parabacteroides</i>	NS_IgA1	3.07794829	0.03057046
	<i>g__Odoribacter</i>	NS_IgA2	3.72840393	0.01555044
		NS_IgM	3.47009731	0.02065127
	f__S24_7_g__	NS_IgM	3.60975716	0.02329023
Proteobacteria	<i>g__Mesorhizobium</i>	NS_IgA1	3.31921232	0.01300205
	f__Caulobacteraceae	NS_IgM	3.37070292	0.04058873
		NS_IgG	3.63611471	0.01230576
	f__Methylobacteriaceae	NS_IgA1	3.35775874	0.03599919
		NS_IgA2	3.75719704	0.02283613
		NS_IgM	3.51147612	0.00425975
		NS_IgG	3.47573924	0.0071757
	f__Phyllobacteriaceae	NS_IgA1	4.19072771	0.00045881
		NS_IgA2	3.95286646	0.0013152
		NS_IgM	4.11243602	0.00821841
		NS_IgG	4.05646959	0.00174647
	<i>g__Sphingopyxis</i>	NS_IgA1	3.80182317	0.00810027
		NS_IgA2	3.82899937	0.01812168
		NS_IgM	3.66489559	0.02653104
		NS_IgG	3.68789253	0.00472461
	<i>g__Sphingomonas</i>	NS_IgG	3.44946932	0.01614725
	f__Sphingomonadaceae	NS_IgG	3.4355464	0.00845578
	<i>g__Sphingobium</i>	NS_IgG	3.35858521	0.02205578
	o__Rhizobiales	NS_IgA1	3.25466478	0.03057046
	<i>g__Nitratireductor</i>	NS_IgA1	3.4406741	0.03292243
	<i>g__Devosia</i>	NS_IgA1	3.1011326	0.03057046
	<i>g__Mesorhizobium</i>	NS_IgG	3.68694146	0.00845578
	<i>g__Paracoccus</i>	NS_IgA1	3.82142257	0.00432953
		NS_IgA2	3.67661853	0.0075333
		NS_IgM	3.72515484	0.00203602
		NS_IgG	3.69527936	0.0005969
	<i>g__Achromobacter</i>	NS_IgM	4.81989041	0.02231092
f__Comamonadaceae	NS_IgG	3.32816665	0.02205578	
<i>g__Variovorax</i>	NS_IgA1	3.37529388	0.01300731	
	NS_IgA2	3.7416328	0.00947996	
	NS_IgM	3.46085914	0.00425975	
	NS_IgG	3.68134574	0.02946554	
f__Halomonadaceae	NS_IgA1	3.04125417	0.03057046	
f__Moraxellaceae	NS_IgA1	3.33881745	0.03057046	
	NS_IgM	3.24181863	0.00517529	

	NS_IgG	3.33202741	0.00845578
f_Pseudomonadaceae	NS_IgA1	3.14320205	0.03057046
	NS_IgM	3.19436505	0.01300205
g_Pseudomonas	NS_IgA1	3.81707137	0.00249691
	NS_IgA2	4.0168883	0.01136927
	NS_IgM	4.31458439	0.00249691
g_Acinetobacter	NS_IgG	4.02242416	0.01136927
	NS_IgA2	3.77502483	0.04554724
	NS_IgM	3.47593577	0.01916549
g_Enterobacter	NS_IgG	3.54686721	0.00511733
	NS_IgM	3.14340216	0.01300205
f_Xanthobacteraceae	NS_IgA1	3.62298343	0.01641189
	NS_IgA2	3.91085346	0.02283613
	NS_IgA1	3.62298343	0.01641189
	NS_IgG	4.01562716	0.00188686
g_Friedmanniella	NS_IgA1	3.61553895	0.03599919
g_Beijerinckia	NS_IgA1	3.34006513	0.02653104
	NS_IgA2	3.72618865	0.01412723
	NS_IgM	3.39255077	0.00810027
	NS_IgG	3.6483629	0.00188686
g_Stenotrophomonas	NS_IgA1	3.06318868	0.01300205
	NS_IgM	3.2690023	0.00064289
	NS_IgG	3.97341177	0.00845578

Nota: Los grupos de bacterias presentes en esta tabla se encuentran mayormente representados en las fracciones de inmunoglobulinas comparados con la total.

## ANEXO2

### 14.2 Aprobación de protocolo de investigación



Dirección de Planeación,  
Evaluación e Investigación  
Unidad de Investigación  
Comité de Ética en Investigación

Ixtapaluca, Estado de México, 18 de marzo de 2021  
Asunto: Dictamen de protocolo de investigación

**DRA. MÓNICA SIERRA MARTÍNEZ**  
**INVESTIGADORA PRINCIPAL**  
**PRESENTE**

Por este medio, me permito comunicarle que el protocolo; **"Caracterización de la microbiota unida a inmunoglobulinas en leche humana y copro de neonatos en población mexicana"** con número de registro **NR-CEI-HRAEI-06-2021**, se presentó en la segunda sesión ordinaria ante el Comité de Ética en Investigación (CEI) del Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca (HRAEI), por lo que el Comité emitió el siguiente dictamen:

**APROBADO**

En atención a lo anterior el protocolo de investigación podrá ser ejecutado y desarrollado en el Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca, dentro de los términos especificados en el proyecto.

Así mismo, le informo que este dictamen empezará su vigencia a partir de la fecha de su emisión, solicitándole se presenten informes técnicos-descriptivos parciales de manera semestral y anual, además de reportar a la Unidad de Investigación la finalización del proyecto.

Sin otro particular, se reitera a su disposición para la concreción de los objetivos.

**ATENTAMENTE**

**DR. PEDRO JOSÉ CURI CURI**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN**  
**HOSPITAL REGIONAL DE ALTA ESPECIALIDAD DE IXTAPALUCA**  
CORREO: ceihraei@hotmail.com  
Tel. 59729800 Ext. 1199

ESTADO DE MÉXICO, SECRETARÍA DE SALUD, HOSPITAL REGIONAL DE ALTA ESPECIALIDAD DE IXTAPALUCA  
CALLE 20 DE FEBRERO DE 1917 S/N IXTAPALUCA, ESTADO DE MÉXICO



## ANEXO 3

### 14.3 Consentimiento Informado

#### **“Caracterización de la microbiota unida a inmunoglobulinas en leche humana y copro de neonatos en población mexicana”**

**Investigador principal:** Dra. en C. Mónica Sierra Martínez

**Sede donde se realizará el estudio:** Hospital Regional de alta especialidad Ixtapaluca

**Teléfono:** 59729800 Ext. 1083

**Investigador asociado:** Dr. Jaime García Mena

**Sede donde se localiza:** Cinvestav, Unidad Zacatenco.

**Teléfono y horario donde localizarlo:** Tel. (55) 5747-3800 Ext. 5328.

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación. 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.**

El establecimiento de la MICROBIOTA en los primeros días es de vida juega UN PAPEL CRÍTICO en el desarrollo post natal del infante ya que en esta VENTANA DE TIEMPO es esencial en la MADURACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE, el desarrollo metabólico y en el CORRECTO DESARROLLO DEL INTESTINO. Debido a que, solo un subconjunto de bacterias de la LECHE MATERNA reside en el intestino del bebé, y que los factores que influyen en la selección de bacterias en el intestino del bebé no se conocen bien, la finalidad de este estudio es identificar cuales BACTERIAS SON “SELECCIONADAS EN LA MADRE” siendo recubiertas por Inmunoglobulinas FAVORECIENDO EL ESTABLECIMIENTO DE ESTAS BACTERIAS BENEFICAS en el infante o la tolerancia inmunológica hacia esta microbiota contribuyendo así a aportar conocimiento sobre los mecanismos de cómo se transfirieren las bacterias y sus efectos en la SALUD a lo largo del DESARROLLO DE LA MICROBIOTA INFANTIL.

#### **OBJETIVOS DEL ESTUDIO.**

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

1. Caracterizar la diversidad bacteriana total de la leche materna, heces infantiles en muestras pareadas.
2. Caracterizar las fracciones bacterianas unidas a IgA, IgM e IgG en leche de mujeres sanas y copro infantil por secuenciación masiva.
3. Comparar los perfiles bacterianos unidos a inmunoglobulinas o libres en los grupos de muestras.
4. Estimar con base a un modelo de asociación si la colonización bacteriana en el intestino infantil es independiente o mediada por inmunoglobulinas de tipo A, M y/o G.

## **BENEFICIOS DEL ESTUDIO**

Entre los beneficios de participar en el estudio se encuentra que la madre podrá conocer la comunidad de bacterias que se encuentran presente en su leche materna, de la misma manera se detectarán los niveles de inmunoglobulinas corroborando que sean normales. De encontrar un problema nos permitirá informar a su médico tratante, a fin de que él conozca el problema y pueda dar un tratamiento oportuno ya sea para la madre o para el bebé.

## **PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO**

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

1. Tomar una muestra de calostro 5 ml (equivalente a una cucharada)
2. Que responda un breve cuestionario referente a datos de su estilo de vida y uso de medicamentos.
3. Del bebé se colectará una muestra de heces después de nacer
4. Las molestias que su hija(o) tendrá serán mínimas, se realizará un seguimiento por el médico tratante

## **ACLARACIONES**

Ni usted ni su hija(o) recibirán pago alguno por participar en este estudio, pero tampoco representará costo alguno para usted. Así mismo le ofrecemos revisar y discutir con usted los resultados encontrados en su hija (o).

Usted no está obligada a participar en este estudio y puede retirarse en cualquier momento, en cualquiera de estas dos situaciones, su relación con los investigadores o con el Hospital Regional de alta especialidad de Ixtapaluca, no cambiará de ninguna manera y seguirá recibiendo los mismos tratamientos y cuidados médicos disponibles en el hospital.

## **CONFIDENCIALIDAD**

Al firmar el consentimiento informado, usted autoriza para que los investigadores o miembros del Comité de Ética del Hospital puedan revisar su expediente clínico con el objeto de evaluar, que el estudio, se está llevando a cabo adecuadamente. Toda la información recogida por los investigadores permanecerá de manera confidencial.

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido resueltas de manera satisfactoria, por el personal. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados 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

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo, Domicilio y Parentesco

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo, Domicilio y Parentesco

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



### ANEXO 3

#### 14.4 Cuestionario de Metadatos Aplicado

FECHA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**CÓDIGO DE LAS MUESTRAS:**

**LECHE FISIOLÓGICA:** \_\_\_\_\_ **COPRO BEBE:** \_\_\_\_\_

#### 1. DATOS DE LA MADRE

<b>NOMBRE Y APELLIDOS DE LA MADRE:</b>			
<b>NIVEL DE ESTUDIOS:</b> Ninguno: ____ Primario: ____ Medio: ____ Superior: ____		<b>LUGAR DE NACIMIENTO:</b>	
<b>SITUACIÓN LABORAL</b> Ama de casa: ____ Estudiando: ____ Trabajando: ____ En desempleo: ____			
<b>EDAD</b> (años cumplidos)	<b>EDAD GESTACIONAL</b> (al momento del parto) < 37 semanas: ____ 37-40 semanas: ____ > 41 semanas: ____		
<b>PARIDAD:</b> Multípara: ____ Primípara: ____		<b>TIPO DE PARTO:</b> Vaginal: ____ Cesárea elección: ____ Cesárea urgencia: ____	
<b>RUPTURA DE MEMBRANAS</b> (antes del parto) ≤ 24 horas: ____ >24 horas: ____		<b>USO DE ANTIBIÓTICOS</b> (último mes de embarazo) SI: ____ NO: ____	
<b>TIPO DE ANTIBIÓTICO:</b>		<b>TIEMPO DE TRATAMIENTO:</b>	
<b>ESTATURA</b> (cm)	<b>PESO</b> (antes embarazo) (Kg)	<b>GANANCIA DE PESO</b> (Kg)	<b>IMC</b> (antes del embarazo)
<b>DIABETES GESTACIONAL:</b> SI: ____ NO: ____		<b>HIPERTENSIÓN ARTERIAL</b> SI: ____ NO: ____	<b>TABAQUISMO</b> SI: ____ NO: ____
<b>INFECCIONES:</b>		<b>TRATAMIENTO</b> (tipo de antibiótico)	

## 2. DATOS DEL RECIEN NACIDO

<b>FECHA DE NACIMIENTO:</b>		<b>TEST DE APGAR:</b>	
		Un minuto _____ 5 minutos _____	
<b>PREMATURO:</b> _____		<b>PRETÉRMINO:</b> _____	
<b>A TÉRMINO:</b> _____			
<b>PESO AL NACER (gramos):</b>		<b>TALLA AL NACER (cm)</b>	<b>SEXO:</b>
< 2500G: ____ 2500-4500g: ____ >			F _____ M _____
4500g: ____			
<b>USO DE ANTIBIÓTICOS:</b> SI: ____ NO: ____		<b>VÍA DE ADMINISTRACIÓN:</b>	
_____		_____	
<b>TIPO DE ANTIBIÓTICO:</b>			
_____			
<b>CONTACTO CON MECONIO:</b>		<b>ASFIXIA:</b>	<b>ECN:</b>
SI: _____ NO: _____		SI: _____ NO: _____	SI: _____ NO: _____
_____		_____	_____
<b>Invasión</b>	<b>Sonda orogástrica</b>	<b>Sonda vesical</b>	<b>Aspiración</b>
Si ____ No ____			
			<b>Cánula endotraqueal</b>
<b>USO DE AMBULANCIA</b>			

## 3. EXTRACCIÓN DE LA LECHE

<b>TIPO DE EXTRACCIÓN:</b>		<b>HORA DE LA TOMA:</b>
Manual: _____ Con bomba: _____		
		<b>TIPO DE ALIMENTACIÓN</b>
		HOMÓLOGA: _____ HETERÓLOGA: _____
		_____

OTRAS OBSERVACIONES:

---



---

NOMBRE Y APELLIDOS DEL ENTREVISTADOR:

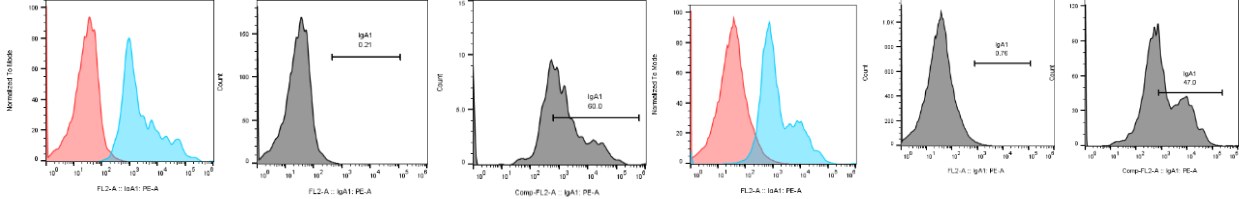
---

# ANEXO 4

## 14.5 Análisis de Datos de Citometría de Flujo

### MACS

#### IgA1



Población negativa y positiva copro

Control negativo

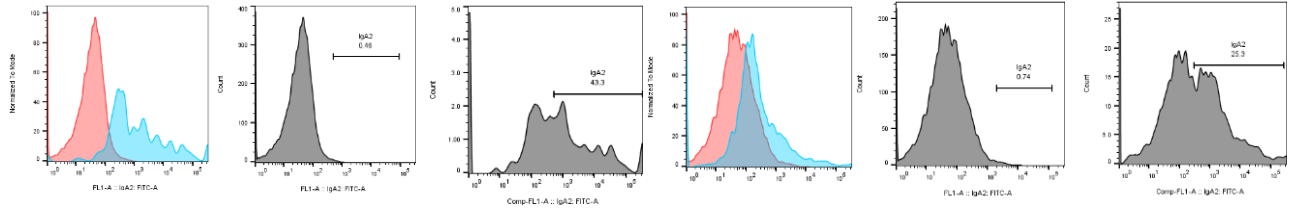
Bacterias positivas

Población negativa y positiva calostro

Control negativo

Bacterias positivas

#### IgA2



Población negativa y positiva copro

Control negativo

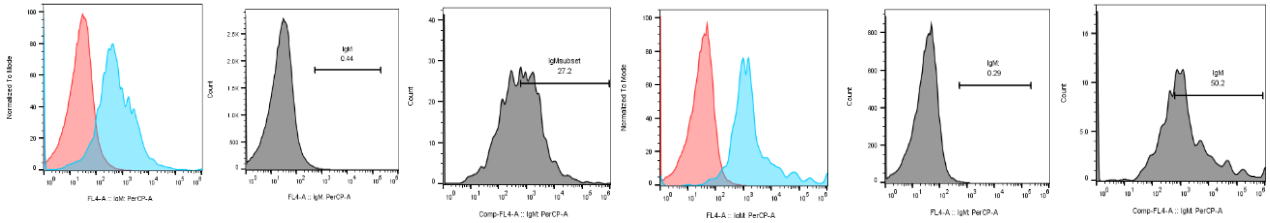
Bacterias positivas

Población negativa y positiva calostro

Control negativo

Bacterias positivas

#### IgM



Población negativa y positiva copro

Control negativo

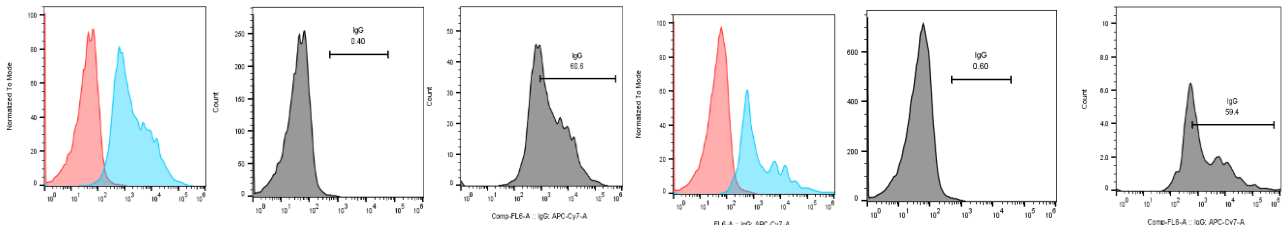
Bacterias positivas

Población negativa y positiva calostro

Control negativo

Bacterias positivas

#### IgG



Población negativa y positiva copro

Control negativo

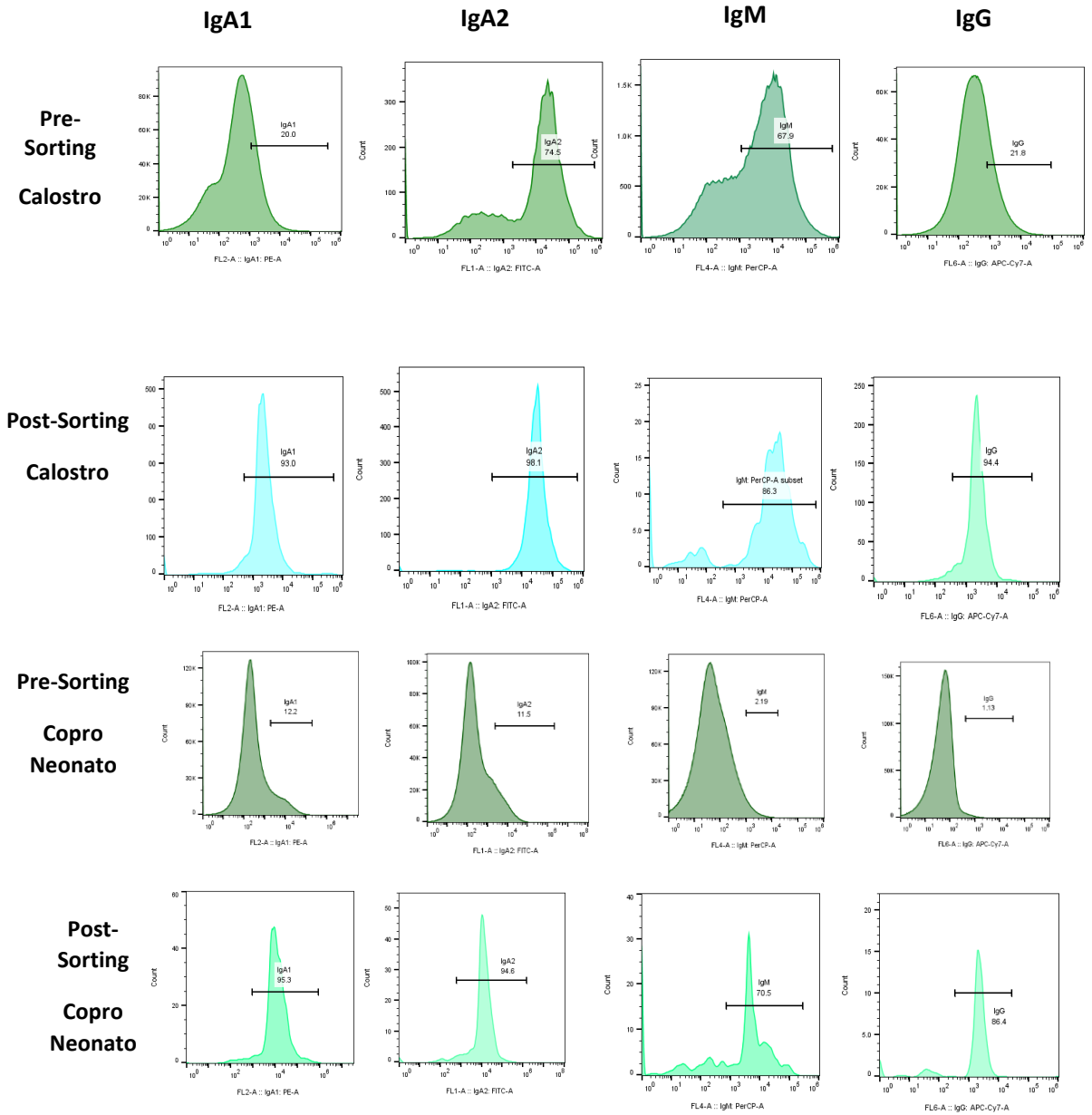
Bacterias positivas

Población negativa y positiva calostro

Control negativo

Bacterias positivas

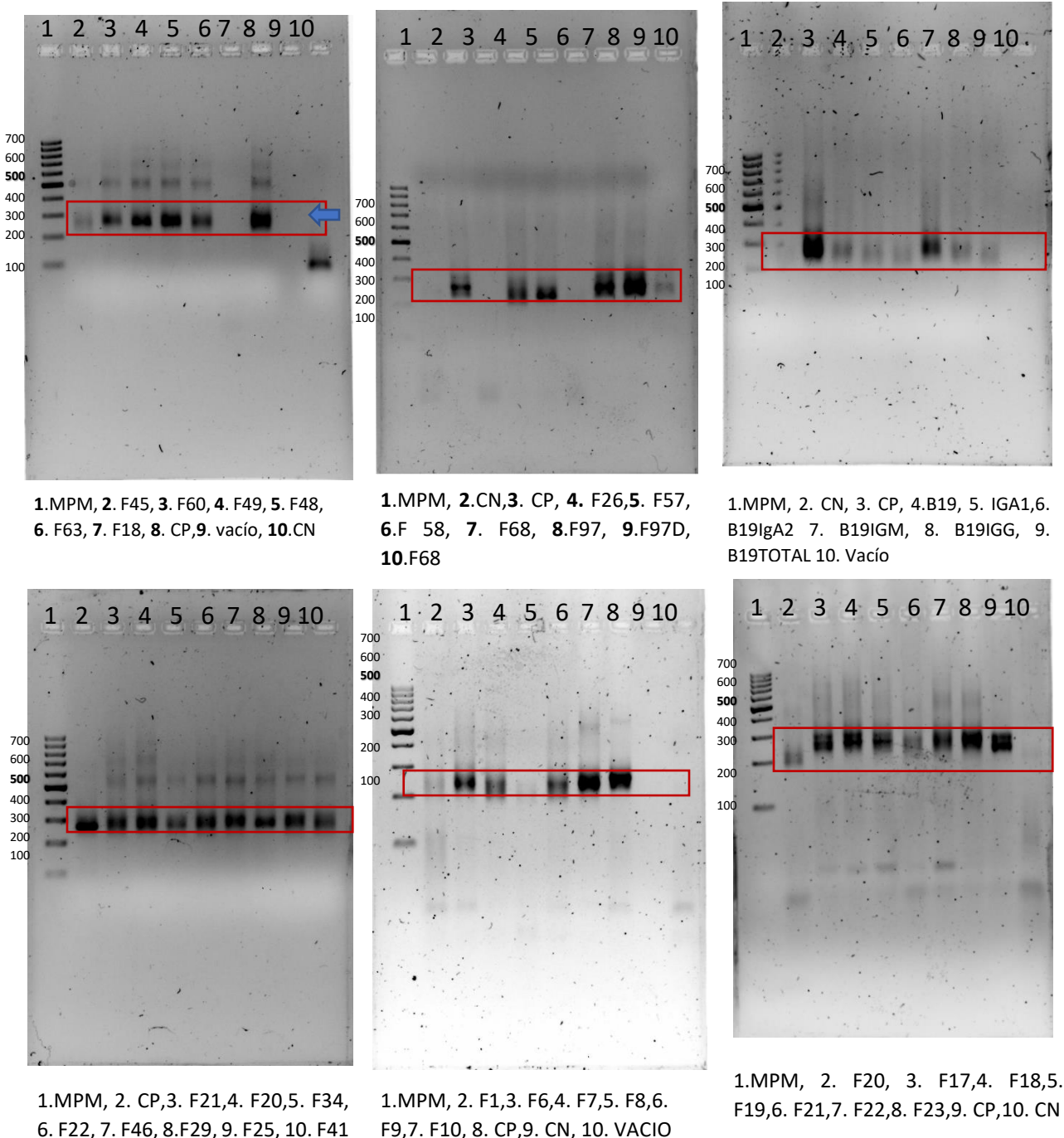
# FACS Análisis de datos

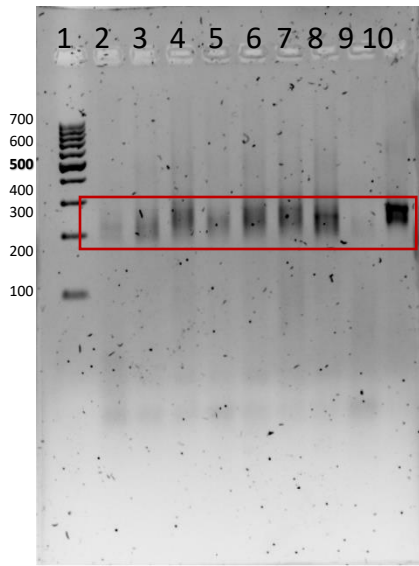


## ANEXO 5

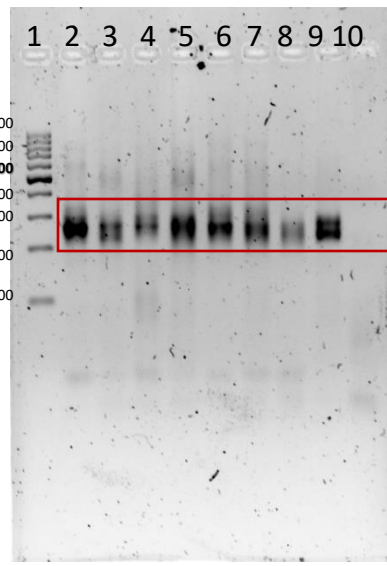
### 14.6 Productos de PCR para genotecas V3 rDNA 16S

Los siguientes geles son Geles de agarosa al 2% teñidos con Midori Green, estos contienen los amplicones de un tamaño de 280 Pb correspondiente a la región V3 del rDNA 16S de las muestras bacterianas unidas a las inmunoglobulinas usadas en este trabajo. El amplicón correspondiente a 280 pb está marcado con un recuadro rojo.

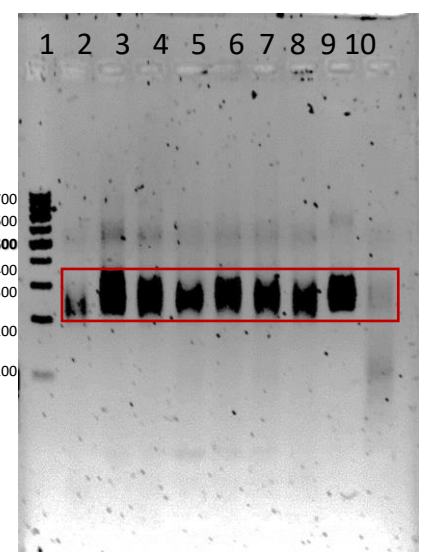




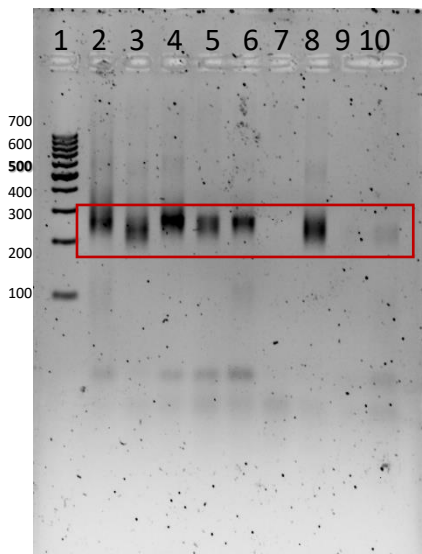
1.MPM, 2. F72,3. F73,4. F74, 5.F71,  
6. F75, 7. F77, 8. F76, 9. CN,10. CP



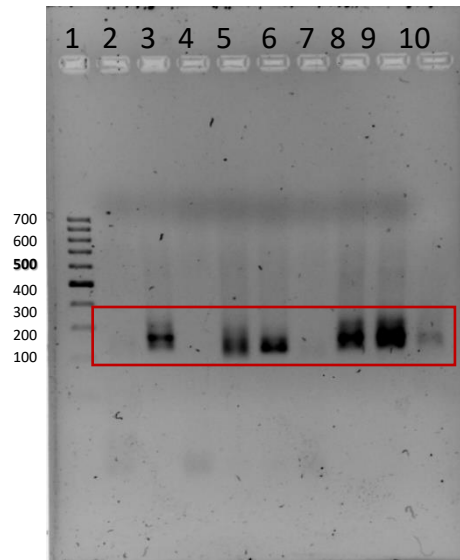
1.MPM, 2. F18, 3. CN,4. F45,  
5. F60, 6. F49, 7. F48, 8. F63,



1.MPM, 2. F31, 3. F32, 4. F33,5. F34,  
6. F35,7. F36,8. F37 9. CP 10.CN



1.MPM,2. F24,3. F25, 4. F26,5. F27,6.  
F28,7. F29,8. F30,9. CN,10. CP



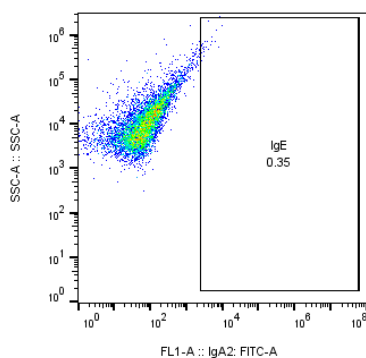
1.MPM,2. CN, 2. CP,3. F26,4. F57,5.  
F58,6. F68,7. F97,8. F97D, 10.F63

## ANEXO 6

### 14.7 Controles de citometría de Flujo

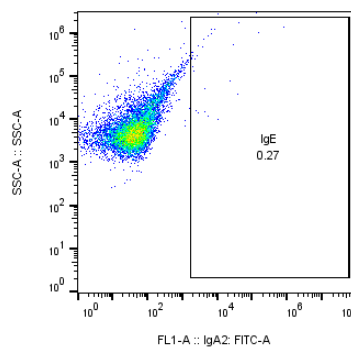
#### Control de Isotipo

##### Auto- fluorescencia



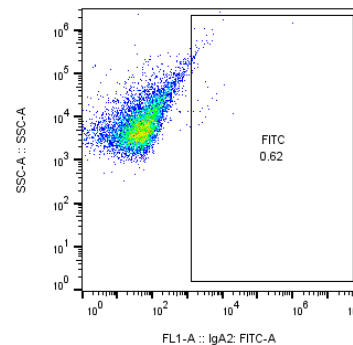
AF BEBE\_Data Source - 1.fcs  
Single Cells  
7510

##### Isotipo: IgE



ISOTIPO BEBE\_Data Source - 1.fcs  
Single Cells  
10235

##### Secundario: FITC

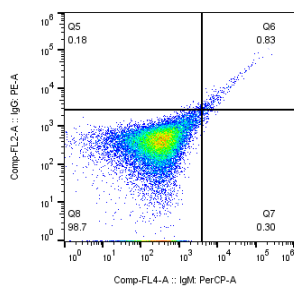


SECUNDARIO-BEBE\_Data Source - 1.fcs  
Single Cells  
9306

#### Control de tinción

##### Auto fluorescencia

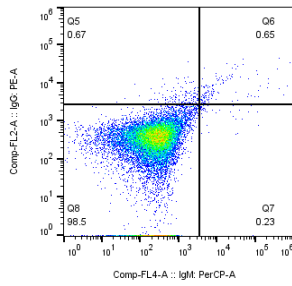
##### IgG e IgM



AF\_Data Source - 1.fcs  
Single Cells  
27271

##### Copro fórmula

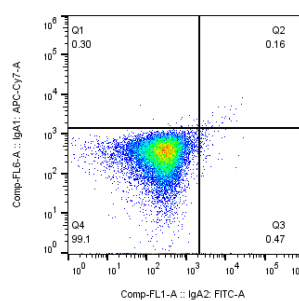
##### IgG e IgM



CONTROL NEGATIVO TM\_Data Source - 1.fcs  
Single Cells  
20047

##### Auto fluorescencia

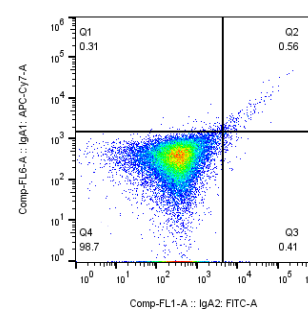
##### IgA2 e IgA1



CONTROL NEGATIVO TM\_Data Source - 1.fcs  
Single Cells  
20047

##### Copro fórmula

##### IgA2 e IgA1



AF\_Data Source - 1.fcs  
Single Cells  
27271