



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL CONTENIDO DE
LACTOBACILLUS DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA HUMANA
Y DE HECES DEL NEONATO EN LACTANCIA EXCLUSIVA.**

Trabajo Especial de Grado

Presentado ante la ilustre

Universidad Central de Venezuela,

Por el Br. **Juan Carlos Freitas Pérez**

Como requisito parcial para optar al

Título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dra. Luz Thomas (IVIC)

Tutor Académico: Roxana Gajardo

Caracas, Venezuela

Marzo, 2015

Dedicatoria

A mi madre por ser la mujer más maravillosa que he conocido

Y creer siempre en mí.

A a mi hijo Luis por ser el maestro e inspiración de mí vida.

A mi abuelo Guillermo, y a mi tía Rita por ser un ejemplo de honestidad, dignidad

Y conciencia, nunca los olvidaré.

Agradecimientos:

A mi madre, abuelos, hermana, hijo y demás familiares con quienes siempre conté cuando más lo necesitaba, y me apoyaron en esta importante etapa de mi vida.

A la profa. Carmen Ferreira, por ser una gran inspiración y ejemplo de respeto y honestidad.

A la Universidad Central de Venezuela, por garantizar que la educación es un derecho, no un negocio, donde me formé y recibí una educación inigualable.

A las profas. Guillermina, Palmira por ser dos de las mejores docentes de la Facultad de Ciencias.

A la Dra. Nelly Diaz, por ser un ser humano tan hermoso y comprensivo, y quien me abrió las puertas a las ciencias con sentido e impacto social.

Al instituto Venezolano de investigaciones científicas (IVIC), al CEA, y a todos los que conforman el Laboratorio de Fisiología Molecular, especialmente a los compañeros estudiantes y post-doctorantes.

A las Técnicas Joanna Bericelli y Cristina Avila, por su paciencia, inmensa ayuda, bonita sonrisa y energía, ¡Muchas gracias!

A la Dra. Estalina Báez, quien con su eterna sonrisa y maravillosa energía, hacía del trabajo un desafío siempre agradable.

A mi tutora Dra. Luz Thomas, quien me guio y con quien aprendí muchas de mis virtudes y defectos, y de quien estoy infinitamente agradecido por haberme dado la oportunidad de aprender acerca de la importancia de la lactancia materna y entrar en el mundo de las ciencias pertinentes, "Muchos éxitos en tan bonita labor".

A la Dra. Adriana Silva, eternamente agradecido de que la vida nos reuniera y nos convirtiera en compañeros de vida y cómplices para un mundo mejor, Muchas gracias por tu comprensión, amor y apoyo incondicional.

A Eduardo G. y Hugo CH.... por haberse atrevido a caminar 10 pasos más hacia el horizonte (utopía).

Y especialmente a la vida... porque la vida es eso...

Índice de Contenido

1. Introducción	10
2. Antecedentes	17
2.1 Selección del gen de ARNr 16S como marcador molecular	17
2.2 Transición de estrategias de identificación del cultivo bacteriano al análisis molecular	18
2.3 Bacteriología de la leche materna humana	18
3. Objetivo general.....	22
3.1 Objetivos específicos.....	22
4. Materiales y métodos.....	23
4.1 Materiales	23
4.2 Métodos.....	23
4.2.1 Muestreo de leche materna y heces del lactante	23
4.2.2 Extracción de ADN	26
4.2.3 Amplificación por PCR de la región que codifica rARN 16S ARN ribosomal.	29
4.2.4 Análisis por electroforesis DGGE.	36
4.2.5 Extracción y elusión de ADN a partir del gel de poliacrilamida DGGE	38
4.2.6 Electro elusión de ADN a partir del gel de poliacrilamida DGGE:	38
4.2.7 re-amplificación del ADN eluido:	39
4.2.8Secuenciación de ADN para la identificación de género y especie bacteriana:.....	39
5. Resultados:	40
6. Discusión:	68
7. Conclusiones:	90
8. Bibliografía	92

Índice de tablas

Tabla 1: Listado parcial de especies bacterianas detectadas mediante técnicas moleculares en leche de mujeres sanas.....	21
Tabla 2. Códigos de las muestras de leche materna y heces del lactante (par madre y lactante).....	26
Tabla 3: Componentes del ensayo de reacción en cadena de la polimerasa.....	35
Tabla 4: Lista de cebadores empleados en la PCR.....	36
Tabla 5. Códigos de las bandas escindidas a partir del gel de DGGE.....	58
Tabla 6. Diferentes condiciones para la PCR anidada.....	86

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de la ruta entero-mamaria	13
Figura 2. Protocolo para aislamiento de ADN de bacterias gram positivas y gram negativas en muestras de leche. Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual (promega).....	27
Figura 3. Protocolo para aislamiento de ADN de bacterias gram positivas y gram negativas en muestras de heces QIAamp DNA Stool, (QIAGEN)	28
Figura 4. Estructura secundaria de la secuencia de ARN ribosomal 16S de <i>E. coli</i> con los sitios de reconocimiento de los diferentes cebadores usados en la PCR.....	30
Figura 5. A: Frecuencia de ocurrencia del residuo nucleótido más común en cada posición de base dentro del gen del ARNr 16S, B. Identificación de especies bacterianas por hibridación in silico con cada cebador (RDP). Representación de la localización y orientación y uso de los cebadores en las PCRs. C. Rendimiento teórico de identificación de cepas bacterianas para cada pareja de cebadores empleadas (RDP).....	33
Figura 6: Esquema del sistema para electroforesis DGGE.....	37
Figura 7. Esquema de una cámara de electro-elución. (-) carga negativa (+) carga positiva. La flecha señala la dirección en la que se desplaza el ADN.....	39
Figura 8. Detección del gen rARN 16S por PCR a dos temperaturas de hibridación, empleando cebadores universales (U968-GC - U1401).....	41
Figura 9. Detección del gen rARN 16S por PCR a partir de templados de ADN obtenidos empleando dos diferentes estuches comerciales, y cebadores universales (U968-GC - U1401).	42
Figura 10. Detección del gen rARN 16S por PCR a dos temperaturas de hibridación, empleando cebadores universales (U968-GC - U1401).....	44
Figura 11. Determinación de la concentración final óptima de cloruro de magnesio para la primera y segunda ronda de PCR anidada, con ADN polimerasa de la casa KAPABiosystems.....	46
Figura 12. Determinación de la concentración final óptima de cloruro de magnesio para la primera ronda de la PCR anidada.....	49
Figura 13. Determinación de las condiciones óptimas de la segunda ronda de la PCR anidada, cebadores L0159 - U0515GC.....	50
Figura 14. Esquema del gel de DGGE.....	52
Figura 15: Re-amplificados de las bandas escindidas a partir del gel de DGGE con cebadores universales (U968 - U1401).....	56
Figura 16. Perfil de bandas en corrida DGGE (30-80% urea), de productos de PCR anidada.....	57
Figura 17. Re-amplificados de las bandas electro eluidas a partir del gel de DGGE empleando cebadores específicos (L0159 - U0515).....	58

Figura 18. Detección por PCR, del gen rARN 16S, empleando cebadores universales (U968-GC - U1401) en ocho muestras del estudio.....	61
Figura 19. Detección por PCR, del gen rARN 16S, empleando cebadores específicos para lactobacilos (L0159-GC - L0677)	62
Figura 20. Análisis de los productos de PCR específica para lactobacillus en DGGE.....	63
Figura 21. Detección por PCR anidada, de segmento del gen rARN 16S, empleando cebadores específicos para lactobacilos	65
Figura 22. Análisis de los productos de PCR anidada en DGGE de las muestras corresponden a los pares de muestra madre e hijo Números 2, 4 y 5.....	67

Resumen

La leche materna es un fluido esencial en la adaptación del recién nacido a la vida extrauterina, debido a su importante carácter nutricional constituye la primera fuente de energética para el lactante. Adicionalmente la lactancia materna exclusiva, provee protección al neonato contra enfermedades infecciosas ya que contiene una gama de factores que pueden modular la respuesta de su sistema inmune intestinal, y optimizar los mecanismos regulatorios de respuesta ante el estímulo que representan los componentes microbianos que colonizan este nicho. Los componentes de la leche actúan sobre el ecosistema microbiano del intestino, promoviendo la proliferación de bacterias probióticas como los *Lactobacillus* o bacteria del ácido láctico, género de bacterias Gram positivas. Esta microbiota previene la unión y viabilidad de bacterias patógenas al epitelio intestinal ayudando así a prevenir enfermedades infecciosas, por lo que la naturaleza parece aprovechar la “experiencia” inmunológica de la madre para dar preponderancia a ciertas especies microbianas por sobre otras y de esta manera influencia y beneficia la composición de la microbiota en el lactante.

Actualmente, se acepta que bacterias no patógenas presentes en la leche materna de madres sanas son componentes naturales de la microbiota de las glándulas mamarias, y no una simple contaminación. Más aún, se considera que el calostro y la leche madura son una constante fuente de bacterias mutualistas, comensales y potencialmente probióticas para el intestino del lactante, debido a que se estima que al ingerir aproximadamente 800 mL de leche al día, se puede recibir entre 10^5 y 10^7 bacterias diarias.

Este Trabajo Especial de Grado propuso identificar la presencia de *lactobacillus* en leche materna humana donada de madres sanas y en muestras de heces de sus hijos, sujetos a lactancia exclusiva. La muestra estudiada fue de 12 parejas de donantes. Se escogieron madres que realizaron parto natural y que no tuvieron prescripción de antibióticos. Las muestras de leche y heces se recolectaron dentro de los primeros 10 días postparto, con excepción de una donante de 5 meses postparto y otra donante con parto por cesaria con la finalidad de ser comparadas con el resto de las muestras. Se aisló el ADN de las muestras y se analizaron por PCR, utilizando para esto cebadores universales para una región del gen del ARN ribosomal16S de bacterias y otros juegos de cebadores específicos para el género *lactobacillus*. Los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa, para verificar la existencia de ADN bacteriano en las muestras procesadas. Adicionalmente, se propuso la técnica de DGGE, que resuelve los productos de PCR del mismo tamaño en función de su secuencia nucleotídica para caracterizar los amplicones. La amplificación con cebadores universales y específicos para *lactobacillus* resultó en la obtención de amplicones, que tienen un perfil de corrida similar en cada una de las duplas heces-leche estudiadas.

A pesar de no haber llegado a la identificación, mediante secuenciación de los amplicones obtenidos por PCR, estos resultados apoyan el hecho de que la leche materna humana contiene bacterias probióticas que transfiere al neonato durante la lactancia y refuerzan la recomendación de ingesta exclusiva de Leche Materna Humana durante los primeros meses de vida.

1. Introducción

La leche materna es un fluido esencial y complejo desde el punto de vista biológico, adaptado para satisfacer los requerimientos nutricionales y energéticos del infante en rápido crecimiento. Adicionalmente a su importante carácter nutricional, se ha hecho evidente el rol de la lactancia en la prevención de enfermedades infecciosas gastrointestinales, enfermedades diarreicas, y problemas respiratorios (AAP, 1997).

Durante los primeros meses de vida del humano, el sistema inmunitario es inmaduro. Siendo la mucosa intestinal el nicho donde se establece la mayor comunidad microbiana del organismo, es natural que exista un desarrollo simultaneo y divergente de procesos de control altamente sofisticados, que deriven en la tolerancia hacia la microbiota normal y la protección contra patógenos (Donnet-Hughes y col, 2010). Se conoce que la leche materna humana contiene numerosos factores que pueden modular la respuesta inmunitaria ante componentes microbianos. Este efecto fisiológicamente protector, muy probablemente sea el resultado de la acción combinada de los distintos componentes de la leche. Entre estos factores encontramos: las células inmuno-competentes, inmunoglobulinas maternas, ácidos grasos, glicoproteínas, lisozimas, oligosacáridos, glicolípidos y proteínas antimicrobianas como lactoferrina y defensinas. Por un lado, estos factores interfieren en la unión y viabilidad de bacterias patógenas al epitelio intestinal, y por otro se aprovecha la experiencia inmunológica de la madre para dar preponderancia a ciertas especies microbianas por sobre otras, influenciando de esta manera la composición

de la microbiota en el lactante, lo cual redundaría en la protección del intestino aun inmaduro del neonato (Lonnerdal, 2003).

Estudios recientes revelan la presencia de una microbiota no patógena en la leche de madres sanas. Debido a esto, se piensa que la lactancia es la principal fuente de bacterias mutualistas, comensales y potencialmente probióticas para el intestino del recién nacido (Martín y col, 2003; Martín y col, 2009), y juegan un papel clave en la iniciación y desarrollo de su microbiota intestinal. La leche materna humana garantiza un aporte continuo de bacterias, ya que se estima que el lactante puede ingerir aproximadamente 800 mL de leche al día y recibir por esta vía entre 10^5 y 10^7 bacterias (Heikkilä y Saris, 2003; Martín y col, 2003), por lo que la composición microbiana en el intestino del neonato podría estar estrechamente relacionada con el contenido microbiano encontrado en la leche de sus respectivas madres. Estos hallazgos se han reportado en poblaciones estudiadas en países distantes entre sí, lo que sugiere que la presencia de estas bacterias en la leche es un hecho común, y más aún, podría ser considerado un componente natural de la microbiota de las glándulas mamarias, y no una simple contaminación (Fernández y col, 2013).

El origen de las bacterias contenidas en la leche materna humana está aun en discusión, lo cual ha sido motivo de controversia los últimos años, de hecho se ha argumentado que éstas provenían de la cavidad oral del lactante o de la piel de la madre (West y col, 1979). Aunque poco se conoce acerca de la microbiota de la saliva en infantes, investigaciones llevadas en adultos revelan que entre las especies más representativas

están los *Streptococcus*, (Nasidze y col, 2009; Yang y col, 2012) siendo este grupo de los más encontrados en leche materna (Jiménez y col, 2008a; Jiménez y col, 2008b; Hunt y col, 2011), lo cual sugiere que la leche materna también podría jugar un rol en el establecimiento de la microbiota bucal.

Por otro lado, bacterias del grupo de los *Staphylococcus*, son comúnmente encontradas en la piel de adultos (Gao y col, 2007; Grice y col, 2009;), así como también en la leche materna humana (Fernández y col, 2013). Sin embargo, al comparar las bacterias detectadas en leche y en la piel de los senos de las madres, se observa que aunque comparten algunos filotipos, existen grandes diferencias entre estas comunidades microbianas (Hunt y col, 2011). Se reconoce que los lactobacilos reportados en la microbiota de leche humana son genéticamente diferentes de las bacterias del mismo grupo aisladas de la piel del hospedador (Martín y col, 2003), lo que sugiere que la microbiota encontrada en la leche materna no proviene estrictamente de la flora de la piel.

Cabe añadir que otros reportes han revelado que bacterias del grupo de los lactobacilos y bifidobacterias encontradas en leche materna, no pudieron ser aisladas a partir de las aureolas de los senos de madres donantes (Gueimonde y col, 2007; Martín y col, 2009;). Considerando que las bifidobacterias pertenecen al grupo de las bacterias estrictamente anaerobias, resulta poco probable que sea la piel del seno la fuente de esta microflora en leche.

El mecanismo mediante el cual, estas bacterias del intestino cruzan la barrera intestinal y llegan a la glándula mamaria esta aun en discusión, aunque algunos trabajos ofrecen evidencias científicas que apoyan la teoría de la ruta entero-mamaria, (figura 1).

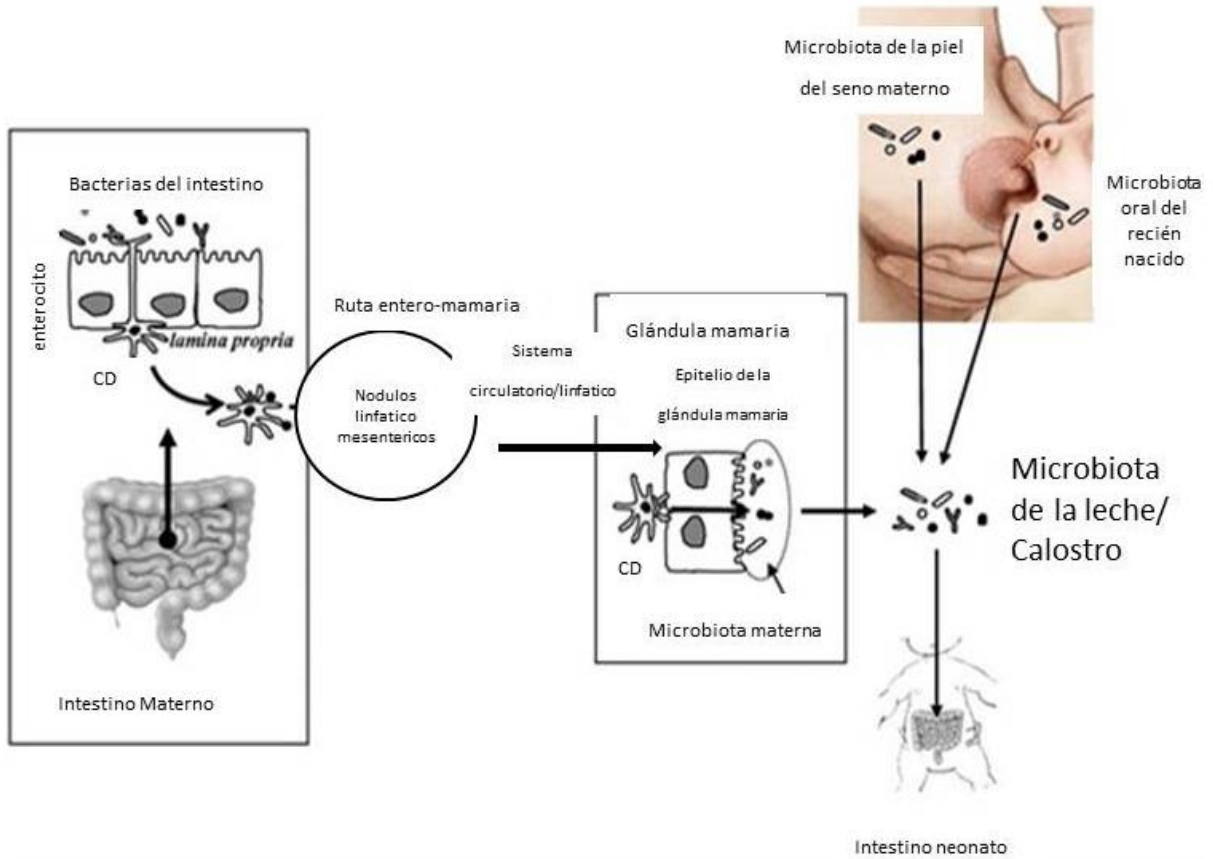


Figura 1. Representación esquemática de la ruta entero-mamaria para el acceso de las bacterias comensales de la microbiota intestinal a la leche materna (Fernández y col, 2013).

Entre la comunidad científica está ampliamente aceptado que las células dendríticas (CD) tienen la capacidad de abrir, mediante la expresión de proteínas de unión estrecha, las vías paracelulares del epitelio intestinal, y proyectarse hacia el lumen intestinal, pudiendo muestrear mediante la expresión de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés), los microbios que continuamente transitan y colonizan el intestino, todo esto sin poner en riesgo la integridad de la barrera epitelial (Rescigno y col, 2001). Adicionalmente, se ha observado que CD intestinales pueden retener bacterias comensales vivas por varios días en los nódulos linfáticos mesentéricos (Macpherson y Uhr, 2004). Por medio de células dendríticas o macrófagos, las bacterias del intestino pueden diseminarse a través del sistema linfático, debido a que los linfocitos antígeno-estimulados, tienen la capacidad de moverse desde el epitelio intestinal hasta sitios distantes como el tracto respiratorio o el genitourinario, glándula salival y más significativamente, la glándula mamaria (Roitt, 2001). Además, se conoce que linfocitos que han sido originados en tejidos linfáticos asociados al intestino son extravasados a la glándula mamaria durante el embarazo tardío y la lactancia, en un proceso regulado por hormonas lactogénicas (Bertotto y col, 1991). Este proceso es el responsable de la abundancia de células inmuno-competentes en la leche materna humana, y podría ser un modelo hipotético para explicar cómo, bacterias provenientes de la microbiota materna podrían ser transferidas al intestino del neonato (Fernández y col, 2013).

La hipótesis de que las células bacterianas viables encontradas en leche materna humana podrían tener su origen en el intestino de la madre y llegar a la glándula mamaria a través de una ruta endógena, que involucra a células dendríticas y macrófagos ha sido

confirmada por los resultados de varios grupos de investigación. Se logró demostrar por un lado que, células dendríticas inmaduras de ratones expuestas a cepas bacterianas aisladas de leche materna humana, fueron estimuladas y se observó la maduración de estas en comparación con otras células dendríticas expuestas a bacterias muertas o partículas inertes, las cuales no indujeron su activación o maduración (Langa, 2006; Langa y col, 2012;). Otro grupo de investigadores, utilizando ratones como modelo experimental, han observado un incremento de la translocación de bacterias desde el intestino a nódulos linfáticos y glándula mamaria en el embarazo tardío y en la lactancia, así como también la presencia de linfocitos con bacterias asociadas a estos, en tejido de glándula mamaria en este periodo (Pérez y col, 2007; Donnet-Hughes y col, 2010). Todos estos resultados parecen confirmar que bacterias derivadas del intestino son transportadas hasta la leche materna dentro de células mononucleares del sistema inmune (Fernández y col, 2013). En concordancia a este argumento otros estudios muestran una transferencia de bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* desde la madre al infante, a través de la lactancia (Martín y col, 2003; Martín y col, 2009; Jiménez y col, 2008a; Makino y col, 2011).

Es un hecho a destacar que la leche humana, está compuesta también por sustancias prebióticas, las cuales pueden estimular selectivamente el crecimiento de un número limitado de bacterias benéficas en el intestino (Dai y Walker, 1999). Entre los ejemplos de prebióticos están los oligosacáridos de la leche humana (HMOs por sus siglas en inglés), los cuales no son digeribles por el recién nacido, pero si por parte de bacterias probióticas tales como bifidobacterias y lactobacilos (Zivkovic y col, 2011), lo que favorece

el crecimiento de estos potenciales probióticos en el tracto intestinal del neonato. Así pues, se reconoce que la leche materna puede proveer un primer inóculo bacteriano al recién nacido y además proveer factores que dirigen la proliferación selectiva de estas especies, determinando así la composición de una comunidad microbiana que beneficie al lactante.

Entre las diferencias importantes, recientemente documentadas entre niños alimentados con leche materna y niños alimentados artificialmente está la microflora del intestino, donde los primeros tienen un porcentaje mucho mayor de lactobacilos, en especial *Lactobacillus bifidus*. Estudios han sugerido que la exposición a estas bacterias por parte de niños alimentados naturalmente ha tenido efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades diarreicas y respiratorias. Adicionalmente es destacable que la práctica del amamantamiento está asociada a tasas significativamente más bajas de asma y dermatitis atópica (Kirjavainen y col, 2001), así como una reducción en el riesgo de contraer otras enfermedades crónicas, como la diabetes y la obesidad (Hunt y col, 2011; Sanz, 2011), por lo cual, el consumo exclusivo de leche materna por lo menos los primeros seis meses de vida son determinantes, dados sus efectos protectores que se extienden más allá del período neonatal y pueden influenciar el desarrollo o no de enfermedades durante toda la vida (Jackson y Nazar, 2006).

2. Antecedentes

2.1 Selección del gen de ARNr 16S como marcador molecular

En la década de los 1960's, Dubnau y col, notaron la existencia de regiones conservadas en la secuencia del gen que codifica ARN ribosomal (rARN 16S) de *Bacillus*. Como consecuencia, el uso de la secuencia de este gen para identificación y taxonomía en bacterias es ampliamente usado, a partir de los trabajos de Carl Woese, quien fue pionero en el uso del rARN 16S, y de cuyos trabajos se originaron las divisiones de los procariotas en dos grupos o reinos: Eubacteria y Archeobacteria. Incluso se propuso a éste como marcador o cronómetro molecular, y permitió establecer las divisiones y subdivisiones dentro de ambos reinos en su trabajo, "Bacterial Evolution" (Woese, 1987). Esto es posible debido a que la comparación de secuencias nucleotídicas demostró la existencia de regiones altamente conservadas entre todos los organismos y otras regiones que varían en diferentes grados (regiones variables). La variabilidad de estas regiones, incrementa en cierta proporción a la distancia filogenética o evolutiva entre dos organismos, lo que permite establecer relaciones filogenéticas y distinguir unos microorganismos de otros (Woese, 1983; Woese, 1987).

El gen rADN 16S tiene una longitud de unos 1500 pares de bases aproximadamente, y cuenta con 9 regiones variables o polimorfismos ínter-específicos los cuales son importantes para la identificación taxonómica. Intercalados entre estas regiones variables están las regiones conservadas, que permite el uso de cebadores universales, diseñados para ser complementarios a éstas (Figura 5 panel A) (Chen y col, 1989; Relman, 1999).

2.2 Transición de estrategias de identificación del cultivo bacteriano al análisis molecular

En muchos estudios microbiológicos, la observación al microscopio de células bacterianas y el posterior sembrado de estas muestras en medio agar no selectivo, arrojaba un número mucho menor de células o unidades formadoras de colonia, en comparación con las vistas en microscopio, y estas diferencias se atribuyeron a la imposibilidad de cultivar la mayoría de las bacterias contenidas en una muestra. Sin embargo, estudios recientes basados en análisis moleculares, demostraron que existía una gran diferencia numérica entre las bacterias existentes en una muestra o ecosistema bacteriano en comparación con las especies detectadas por el método de cultivo. Es de esta forma como se desarrolla y se hace extensivo el uso de técnicas moleculares o “cultivo-independiente” para el estudio de muestras y ecosistemas microbianos complejos (Zoetendal y col, 2004).

2.3 Bacteriología de la leche materna humana

La leche humana muy pocas veces fue fuente de estudio microbiológico, a diferencia de la leche procedente de vaca, cabra y búfala, debido al condicionamiento en la calidad de esta última como producto comercial. Ocasionalmente se ha procedido a la detección e identificación de bacterias potencialmente patógenas de leche humana almacenada en bancos, en casos de infecciones neonatales humanas, pero los estudios microbiológicos de la leche humana obtenida directamente de mujeres sanas ha sido muy escaso ya que históricamente y hasta hace muy pocos años se pensó que éste era un fluido estéril.

Los datos disponibles hasta años recientes, indican que entre las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia a partir de leche materna destacan diversas especies de los

géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* y *Leuconostoc* (Heikkilä y Saris, 2003; Martín y col, 2003). (Tabla 1).

Por otra parte, recientemente se ha confirmado que la concentración de lactobacilos y enterococos es significativamente más elevada en la microbiota intestinal de niños lactantes, en comparación a niños alimentados con fórmulas lácteas (Ahrné, y col, 2005; Rinne y col, 2005). Esto no parece ser un hecho aislado, ni un fenómeno dependiente del lugar geofísico, ni las diferencias socio-económicas o culturales, ya que se han aislado bacterias de dichos géneros en muestra de leche de madres radicadas en países distantes, lo que hace pensar que éstas constituyen la microbiota natural de la leche humana (Rodríguez y col, 2008). Entre las bacterias comúnmente aisladas de leche materna se tienen especies de lactobacilos como *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. fermentum* o *L. faecium*, las cuales poseen un potencial probiótico similar o mayor a ciertas cepas ya comercializadas (Martín y col, 2004; Martín y col, 2006).

La aplicación de métodos moleculares basados en la utilización del gen que codifica el ARN ribosomal 16S (rADN), ha confirmado que la leche materna es una buena fuente de estafilococos, estreptococos, y bacterias lácticas, pero además se han descubierto que algunas bacterias como *Escherichia coli*, también están contenidas en leche, y su presencia no contradice el hecho de que la microbiota del intestino del lactante deriva de la microbiota contenida en la leche materna (Heikkilä y Saris, 2003; Martín y col, 2003).

Tabla 1: Listado parcial de especies bacterianas detectadas mediante técnicas moleculares en leche de mujeres sanas.

<i>Lactobacillus</i>	Otras bacterias lácticas	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. bovis</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. mitis</i>
<i>L. gastricus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. oralis</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. parasanguis</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>Leuconostoc fallax</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. salivarium</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. infantis</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		<i>S. peroris</i>
<i>L. vaginalis</i>	<i>Weissella cibaria</i>		
	<i>Weissella confusa</i>		

Tomado y modificado de (Rodríguez y col, 2008)

El proceso que da lugar a que células mononucleares del sistema inmune materno engloben bacterias del intestino de la madre, y transloquen hasta aparecer en la glándula mamaria parece incrementarse en el embarazo y la lactancia, según resultados experimentales realizados en ratones (Pérez y col, 2007). Estos estudios hacen suponer que, mediante la exposición temprana a un conjunto elite de componentes microbianos, el sistema inmune del neonato es preparado para reconocer patrones bacterianos específicos y responder apropiadamente a organismos comensales y patógenos de forma diferencial (Pérez y col, 2007). Esta suposición es soportada por la hipótesis de la diversidad microbiana (Matricardi, 2010; Von Hertzen y Haahtela, 2011), que sostiene que la diversidad y el recambio de especies bacterianas en la mucosa intestinal es un factor clave en la regulación del sistema inmune, en lugar de la colonización estable con una especie en particular. No está claro si es la diversidad en sí, o es que en una población diversa se incluirá a ciertos organismos preponderantes como los que hemos referido anteriormente, sin los cuales el sistema inmune no se desarrollaría adecuadamente. El sistema inmune embrionario en este sentido, puede ser comparado con una computadora que contiene programas pero pocos datos asociados a estos. Durante la gestación y la infancia, la exposición a diversos microorganismos constituye una “base de datos” que permite al sistema inmunitario identificar y responder a agentes nocivos (Rook y col, 2013).

3. Objetivo general

Determinar la presencia de bacterias ácido lácticas en el binomio madre-lactante a partir del estudio de muestras de leche materna y heces a través de métodos moleculares.

3.1 Objetivos específicos

- Extraer ADN total contenido en las muestras tanto de leche materna como de heces de los neonatos.
- Estandarizar las condiciones óptimas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar la presencia tanto de bacterias en general (cebadores universales), como de bacterias lactobacilos (cebadores específicos para lactobacilos), en muestras de leche materna y heces.
- Determinar por PCR mediante el uso de cebadores (bacterianos) universales y cebadores para lactobacilos, que reconocen la porción de ADN ribosomal 16S, la presencia de estas bacterias en muestras de leche materna y heces.
- Analizar mediante una corrida electroforética en un gel en gradiente de condiciones desnaturalizantes (DGGE), los productos de PCR de las muestras de leche y heces.
- Purificar y amplificar por PCR las bandas obtenidas en el DGGE.
- Identificar mediante secuenciación los organismos contenidos en las muestras a partir de los segmentos resueltos por DGGE.

4. Materiales y métodos

4.1 Materiales

- Extractor de leche AVENT
- Kit para PCR:

PlatinumTaq DNA Polymerase de la casa comercial INVITROGENy

KAPA Taq HotStart PCR Kit de la casa comercial KAPABIOSYSTEMS

- Termociclador: Eppendorf mastercycler gradients
- Cámara para DGGE: Bio-Rad Protean II xi cell
- Registro fotográfico: Alliance 4.7 Ubitec Cambridge
- kits de extracción de ADN:

Para muestras de heces: QIAamp DNA Stool, (QIAGEN).

Paramuestras de leche:wizard Genomic DNA purification kit (PROMEGA).

4.2 Métodos

4.2.1 Muestreo de leche materna y heces del lactante

Este estudio cuenta con el aval de la Comisión de Bioética del IVIC, y se procedió luego de obtener el consentimiento informado por parte de las donantes.

Para el muestreo se pidió la colaboración de madres sanas, y con plena conciencia del alcance y objetivo del proyecto, el cual se desarrolla en colaboración establecida entre el laboratorio de Fisiología Molecular (IVIC), y el Centro Obstétrico Aurora Madre, con el apoyo del Dr. Beltrán Lares, médico obstetra. Este grupo tiene entre sus metas, el parto

respetado. Este consiste en la práctica del alumbramiento natural, sin prescripción de antibióticos, y con apego temprano, de manera de garantizar lactancia exclusiva para el neonato.

El criterio de inclusión usado para las donantes fue el de haber dado a luz de forma natural y a término (9 meses), haber practicado la lactancia en forma exclusiva y sin la administración ningún antibiótico que pudiera alterar el contenido bacteriano en las muestras.

El criterio de exclusión fue el parto prematuro o que la madre haya padecido de mastitis o algún proceso inflamatorio asociado a la mama.

Una vez obtenido el consentimiento informado de las madres donantes, se procedió a la recolección de una única muestra que consiste en un volumen mínimo de 20mL de leche materna fresca (directamente del seno de la madre), utilizando un “tira leche” comercial el cual previamente se esterilizó con agua hirviendo por 10 minutos y luego se dejó en campana de flujo laminar por 10 minutos bajo luz UV antes de su empaqueo, donde se mantuvo hasta el momento de la extracción de la muestra en la vivienda de la madre. La leche se trasvasó a un recipiente estéril de 50mL, y se colocó en una cava con hielo hasta llegar al laboratorio donde se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

Se tomó una muestra de heces del lactante, el mismo día del muestreo de la leche y se transportó y almacenó de la misma manera que la leche de la madre.

El total de muestras (par madre y lactante), fue de 12, lo que constituye 12 muestras de leche materna y 12 muestras de heces.

Tabla 2. Códigos de las muestras de leche materna y heces del lactante (par madre y lactante). Todas las muestras se recolectaron en los primeros 10 días postparto, a excepción de la donante 5 (5 meses postparto), y la donante 12 (15 días postparto).

Código de donante	Código de muestra leche materna	Código de muestra de heces del lactante
1	1 – M	1 - B
2	2 – M	2 – B
3	3 – M	3 – B
4	4 – M	4 – B
5	5- M	5 – B
6	6 – M	6 – B
7	7 – M	7 – B
8	8 – M	8 – B
9	9 – M	9 – B
10	10 – M	10 – B
11	11 – M	11 – B
12	12 - M	12 – B

4.2.2 Extracción de ADN

Se extrajo ADN total de las muestras de leche usando el kit comercial PROMEGA (Wizard Genomic DNA purification kit), con una modificación en la cantidad de leche usada. La modificación se debe a que el contenido bacteriano en leche humana parece no ser suficiente para el volumen que recomienda en el kit (1 mL), por lo que en nuestro caso se usó un mínimo de 20 mL de muestra, para garantizar suficiente cantidad de ADN para la reacción de amplificación PCR que se realizaría más tarde.

El volumen de leche materna se centrifugó a 10.000g por 10 minutos con el propósito de tener un primer paso de descremado, donde se obtuvo una fase lipídica (la cual se descartó), y una fase acuosa, con la cual se re-suspendió el sedimento. Esta fase acuosa se repartió en varios tubos de 1,5 mL y luego se procedió a centrifugar a 14.000g por 10 minutos, con la finalidad de separar aún más la grasa contenida en la leche, y sedimentar las células contenidas en la muestra. El sobrenadante se descartó conservando un pequeño volumen que sirvió para re-suspender el sedimento, el cual se pasó a un tubo de 1,5 mL nuevo. Este procedimiento se repitió con todos los tubos de 1,5 mL de manera obtener un volumen de entre 1 y 1,5mL de muestra inicial lo cual es lo recomendado por el fabricante en el paso de extracción. Este tubo de 1,5 mL se centrifugó a 14.000g para sedimentar las células en la muestra, se descartó el sobrenadante y se re-suspendieron las células en 480 μ L de EDTA 50mM y 60 μ L de Lisozima (20mg/mL) y se prosiguió con los pasos siguientes descritos en el protocolo del Kit figura 2.

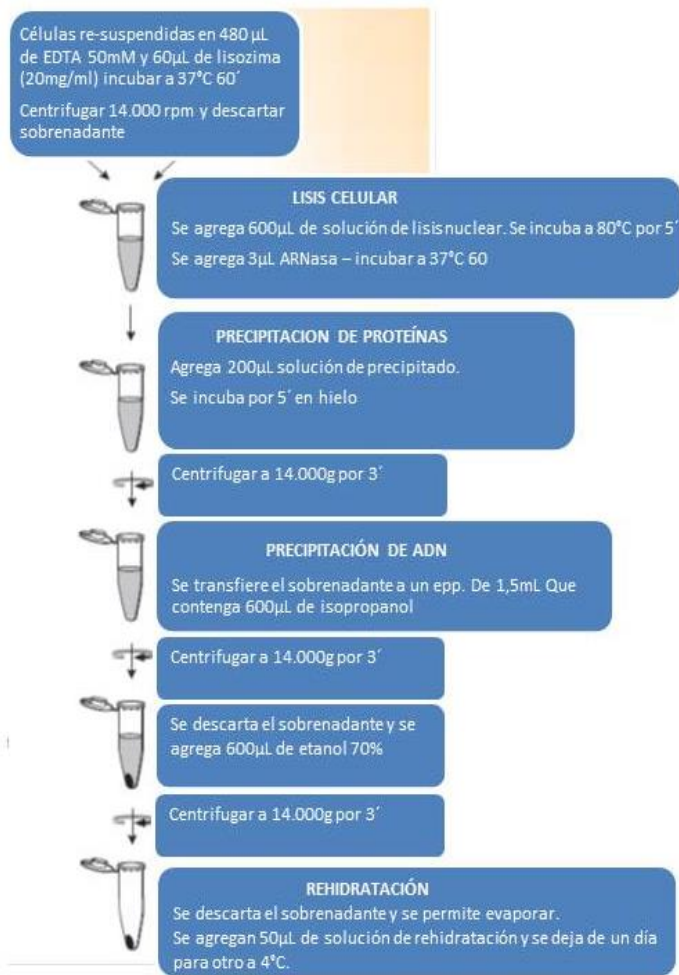


Figura 2. Protocolo para aislamiento de ADN de bacterias gram positivas y gram negativas en muestras de leche. **Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual** (promega). Tomado de:

<http://www.promega.com/~media/files/resources/protcards/wizard%20genomic%20dna%20purification%20kit%20quick%20protocol.pdf> [consulta: 18 de febrero de 2014]

En el caso de las heces del lactante el aislamiento de ADN se realizará siguiendo las instrucciones del kit **QIAamp DNA Stool, (QIAGEN)** sin ninguna modificación (figura 3).

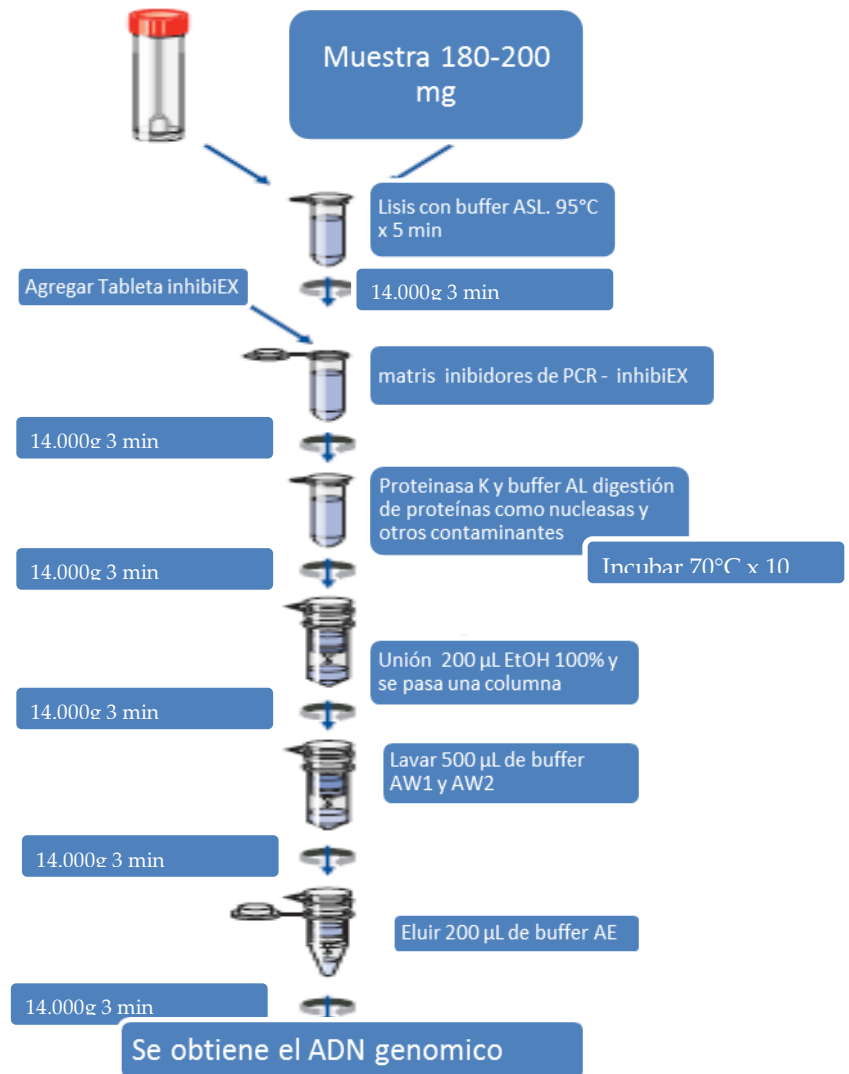


Figura 3. Protocolo para aislamiento de ADN de bacterias gram positivas y gram negativas en muestras de heces **QIAamp DNA Stool, (QIAGEN)**. Tomado de:

http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/qiagen/1018546_HBQASToolmin_082001.pdf

[Consulta: 18 de febrero de 2014]

4.2.3 Amplificación por PCR de la región que codifica rARN 16S ARN ribosomal.

Se realizó una reacción de amplificación (PCR) de una región de ADN que codifica ARN ribosomal 16S de la subunidad menor del ribosoma (30S) de procariontes, esta región es un marcador molecular para la identificación de especies bacterianas (Woese, 1983; Woese, 1987).

Se utilizó un par de cebadores universales para bacterias **U968** Sentido y **U1401** Anti-Sentido (Zoetendal y col, 1998). Adicionalmente se usaron dos pares de cebadores para una PCR anidada específica para lactobacilos: cebadores externos **U0011** Sentido (Poulsen y Stahl, 1993) y **L0677** Anti-Sentido (Heilig y col, 2002), y los cebadores anidados: **L0159** Sentido (Heilig y col, 2002) y **L0515** Anti-Sentido (Lane, 1991).

Los cebadores universales para bacterias: **U968(S)** 5'- AAC GCG AAG AAC CTT AC- 3' y **U1401(AS)** 5'- CGG TGT GTA CAA GAC CC- 3', que hibridizan con regiones conservadas comunes para todas las bacterias y flanquean las regiones variables (V6-V8) del gen que codifica ARN ribosoma 16S de (Zoetendal y col, 1998). El producto de PCR es de 500 pb, y sirvió para verificar la presencia de ADN bacteriano en las muestras procesadas tanto de leche como de heces del lactante.

Los números de cada uno de los cebadores señalan en que sitio del gen rADN 16S son complementarios estos (figura 4).

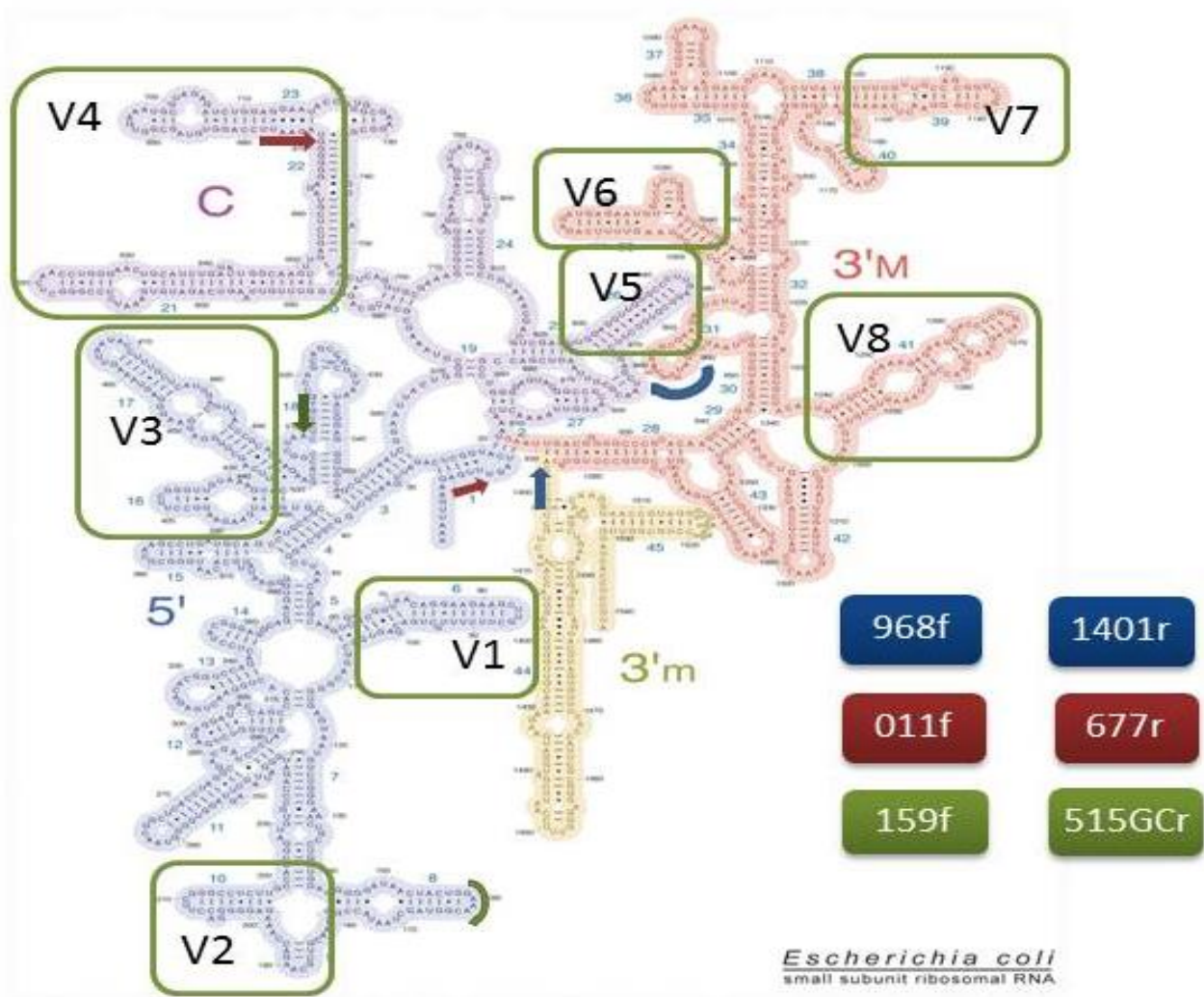


Figura 4. Estructura secundaria de la secuencia de ARN ribosomal 16S de *E. coli* con los sitios de reconocimiento de los diferentes cebadores usados en la PCR.

Tomado de: http://rna.ucsc.edu/rnacenter/ribosome_images.html (Center of Molecular Biology of RNA University of California) [consulta: 22 de abril de 2014]

Para el análisis de productos de PCR y la identificación de lactobacilos mediante DGGE se realizó una PCR anidada, dirigida a detectar bacterias del género de los *Lactobacillus*.

El control positivo utilizado para la PCR anidada fue un diluido de Liolactil, un polvo para suspensión oral el cual contiene un cultivo liofilizado de *Lactobacillus rhamnosus* (equivalente a 8×10^8 UFC/g).

En la primera ronda de amplificación de PCR figura 5 panel B, se utilizó un cebador universal U0011(S) complementario a la posición 11- 28 (Poulsen y Stahl, 1993;) y un cebador grupo específico para Lactobacilos L0677(AS) diseñado para ser complementario en la posición 677 (Heilig y col, 2002).

Para la segunda ronda de amplificación Figura 5, se utilizó el par L0159(S) complementario a la posición 158, que corresponde a un sitio conservado para los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Heilig y col, 2002) y el cebador L0515(AS) complementario a posición 515. Estos cebadores flanquean las regiones variables V2 y V3 Figura 4 y 5.

Se reporta que las bacterias que fueron detectadas mediante la PCR anidada son:

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus salivarium*, *Leuconostoc sp.*, y *Pediococcus sp.* (Heilig y col, 2002).

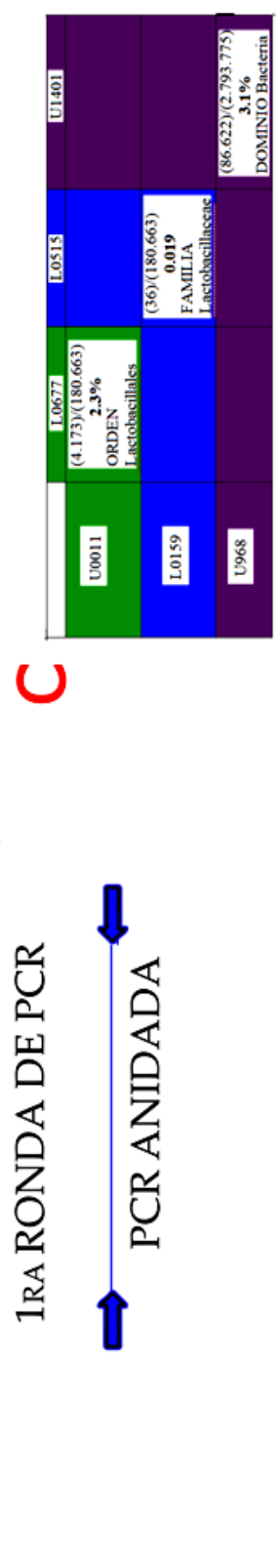
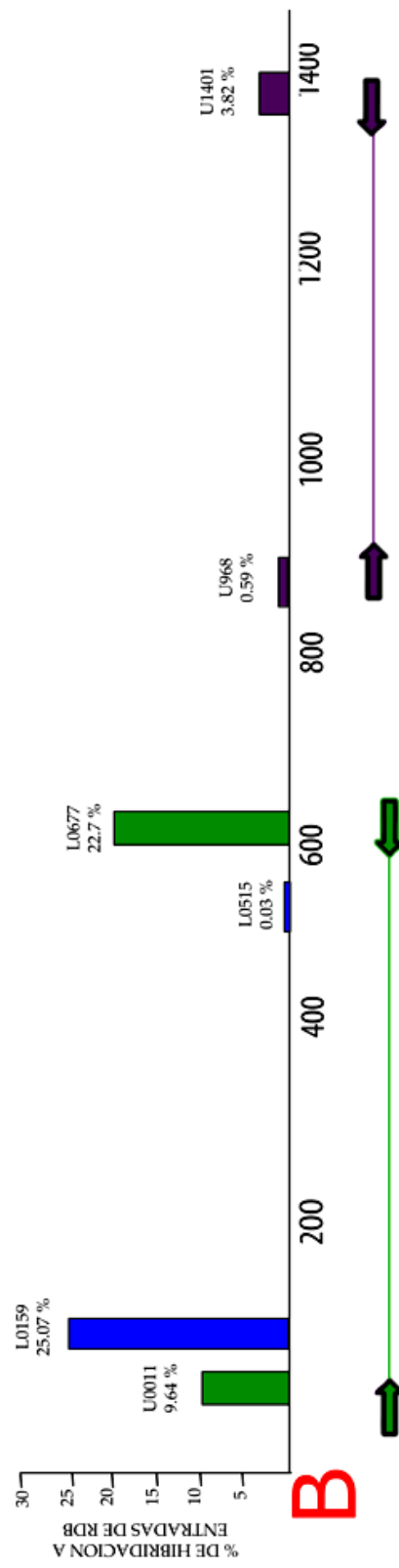
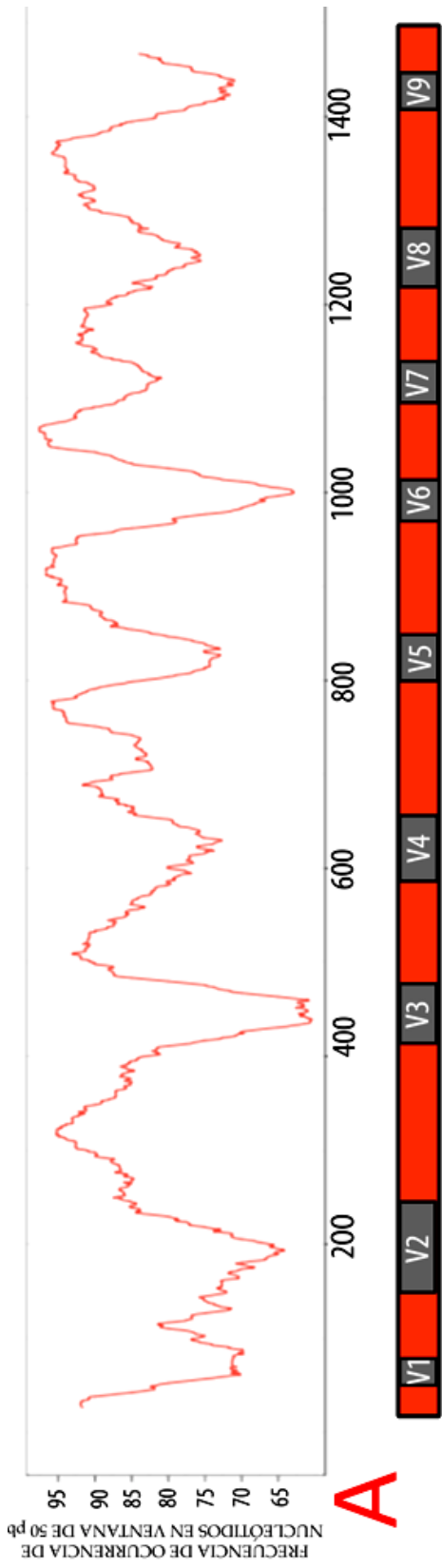


Figura 5. A: Frecuencia de ocurrencia del residuo nucleótido más común en cada posición de base dentro del gen del ARNr 16S, ésta se determinó a partir de una lista de 4383 cepas (fuente RDP Ribosomal Database Project) con E. coli U00096 como referencia. Estas frecuencias son medidas de la variabilidad en el gen, la gráfica se genera mediante la adopción de la frecuencia promedio dentro de ventana de 50 bases, moviendo una base a la vez a lo largo del gen. La ubicación de las regiones hipervariables están etiquetados con barras grises definen las regiones de V1 a V9 (tomado de Appl. Environ. Microbiol. 2005, 71(12):7724). B. Identificación de especies bacterianas por hibridación in silico con cada cebador (RDP). Representación de la localización y orientación y uso de los cebadores en las PCRs. C. Rendimiento teórico de identificación de cepas bacterianas para cada pareja de cebadores empleadas (RDP).

Al cebador L0515GC(AS), se le adicionó una “grapa” que consiste en una secuencia en el extremo 5’ enriquecida en G-C (40 nucleótidos entre guaninas y citocinas):5’- **(CGC CGG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G)** - ATC GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA 3’ (Muyzer, de Waal y Uitterlinden, 1993).

Esta secuencia adicional en el extremo 5’ permite una correcta separación de los fragmentos de ADN obtenidos de la reacción de PCR en la corrida DGGE. Los productos de la PCR anidada fueron usados para correrlos en una electroforesis en gel en gradiente lineal desnaturizante, (DGGE) con la finalidad de identificar las especies bacterianas de las muestras procesadas.

Las condiciones de temperatura para la primera ronda de PCR:

Un primer paso de 95°C (desnaturalización) por 5 minutos, seguido de 35 ciclos con temperaturas de 95°C (desnaturalización), 30 segundos, 66°C (temperatura de hibridación) por 30 segundos, y 72°C (elongación) por 1 minuto. Se finaliza con 10 minutos a 72°C (elongación final). El tamaño de producto esperado es de 700pb aproximadamente.

Las condiciones de temperatura para la segunda ronda de PCR:

Un primer paso de 95°C (desnaturalización) por 5 minutos, seguido de 35 ciclos con temperaturas de 95°C (desnaturalización) por 40 segundos, 58°C (temperatura de hibridación) por 30 segundos, y 72°C (elongación) por 1 minuto. Se finaliza con 10 minutos a 72°C (elongación).

Tabla 3: Componentes del ensayo de reacción en cadena de la polimerasa

Componentes de la mezcla para la PCR	Volúmenes por reacción (concentración final en 50 µL)	Volúmenes por tubo de reacción (concentración final en 50 µL)
	Cebadores universales U968-GC U1401	PCR ANIDADA
H ₂ O	Completar hasta 50 µL	Completar hasta 50 µL
¹ Buffer PCR (10X)	1X	1X
dntp's (10 mM)	0,2 mM	0,2 mM
² MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	3mM
Cebador (sentido) (2 µM)	0,2 µM	0,2 µM
Cebador (anti-sentido) (2 µM)	0,2 µM	0,2 µM
KAPA Taq HotStart (kapa biosystem)	1 U	1 U
ADN (molde)	4,0 µL	4,0 µL

¹Buffer PCR +MgCl₂ (la concentración final del MgCl₂ a 1X es de 1.5 mM), se suplementa con MgCl₂ (25 mM) según sea el caso.

²Concentración final de MgCl₂ 1° ronda de PCR (2mM) 2° ronda de PCR (3mM).

Tabla 4: Lista de cebadores empleados en la PCR

Cebadores	Secuencias	Sitio de Reconocimiento	Blanco	Referencia
*U968-GC (S)	5'- AAC GCG AAG AAC CTT AC- 3'	968	Bacteria	Zoetendal y col, 1998
U1401 (AS)	5'- CGG TGT GTA CAA GAC CC- 3'	1401	Bacteria	Zoetendal y col, 1998
U0011(S)	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	11	Bacteria	Poulsen y Stahl, 1993
L0677(AS)	5'- CAC CGC TAC ACA TGG AG-3'	677	<i>Lactobacillus</i>	Heilig y col, 2002
L0159 (S)	5'- GGA AAC AG(A/G) TGC TAA TAC CG -3'	159	<i>Lactobacillus</i>	Heilig y col, 2002
*U0515(AS)	5'- ATC GTA TTA CCG CGG CTG GCA 3'	515	<i>Lactobacillus</i>	Lane, 1991
Grapa GC	5'- (CGC CGG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) – 3'			Muyzer, de Waal y Uitterlinden, 1993

*Una grapa G-C es adicionada al extremo 5' del cebador El cebador (antisentido) L0515GC(AS) según Muyzer, de Wall y Uitterlinden, 1993.

4.2.4 Análisis por electroforesis DGGE.

Tomando en cuenta que el producto de 400 pb de la PCR anidada está compuesto por tantas secuencias como bacterias del grupo de los lactobacilos este contenido en la muestra (Para leche materna y heces del lactante), estos fueron corridos en una electroforesis en gradiente lineal desnaturalizante (DGGE) de manera de poder separar los diferentes fragmentos de igual tamaño, de acuerdo a sus diferencias en la secuencia nucleotídica.

El gradiente lineal desnaturalizante estará en un rango de 30% a 80% de urea, en un gel de poliacrilamida al 6%, a partir de una solución de acrilamida/bisacrilamida 37.5: 1 (40%). Cada banda que se resuelva y sea visualizada en la corrida, se tomará como una posible especie bacteriana por separado. Haciendo énfasis en las bandas más intensas y mejor resueltas en el gel, y las bandas que tengan el mismo perfil de corrida entre los carriles de leche materna y heces de su respectivo lactante. Estas últimas tienen especial importancia ya que son candidatas a ser relacionadas como inóculo a partir de la leche materna y colonización de la bacteria en tracto intestinal.

Para el DGGE se necesitan 7 litros de buffer de corrida se distribuyen en 3L en la cámara de electroforesis y 4 litros en la fiola que sirve de reservorio. Todo el buffer es continuamente recirculado durante el tiempo que dura la corrida, (6 horas) mediante una bomba peristáltica. Esto permite que el buffer mantenga su fuerza iónica. La corrida tiene una duración de 6 horas a 250 voltios. Todo el sistema es mantenido a 60°C mediante el calentamiento del buffer, y la recirculación de agua figura 6.

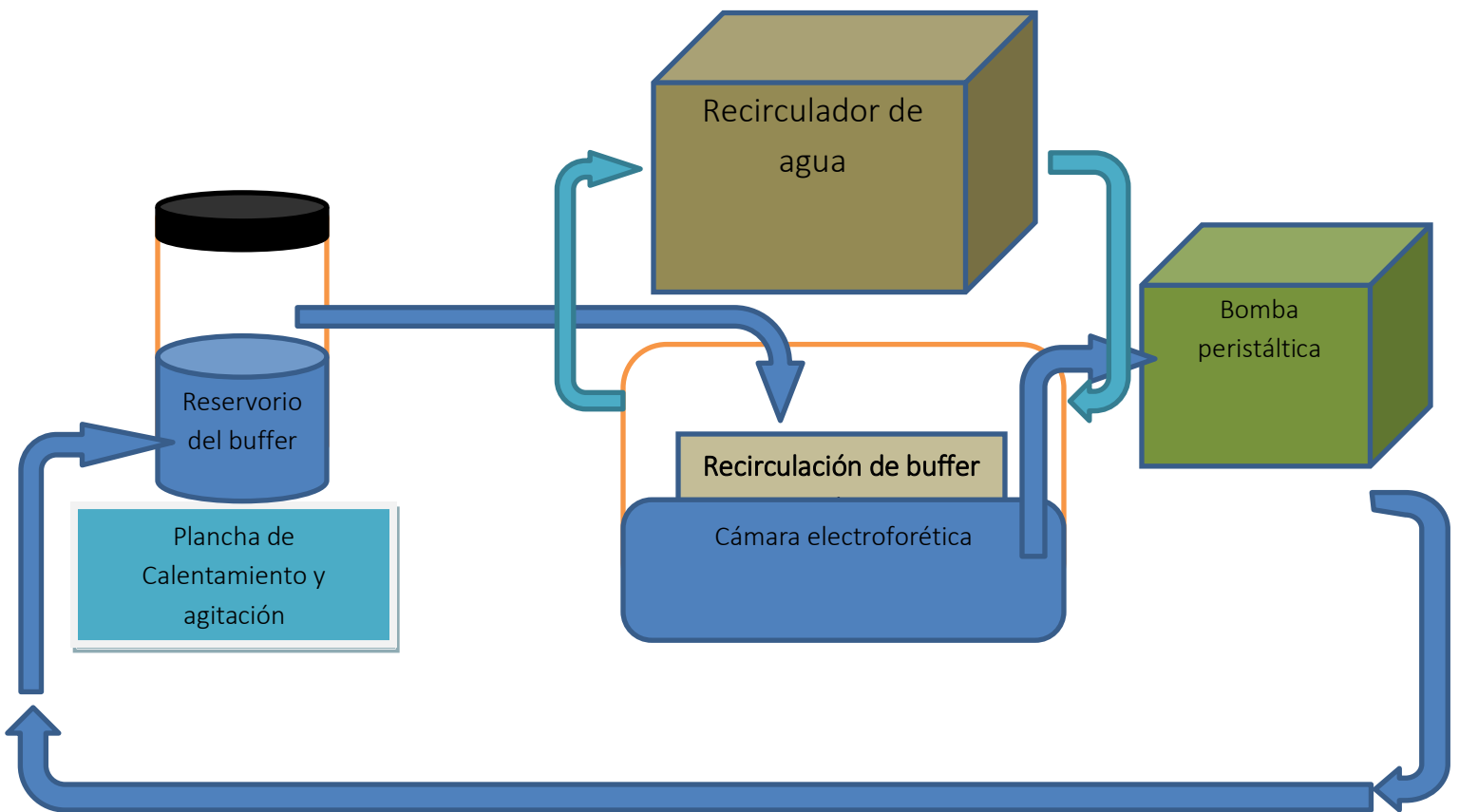


Figura 6: Esquema del sistema para electroforesis DGGE.

4.2.5 Extracción y elusión de ADN a partir del gel de poliacrilamida DGGE

Las bandas separadas por DGGE se analizaron y se identificaron como “de interés”, según los siguientes parámetros:

Todas las bandas que se lograron separar y resolver adecuadamente.

De estas bandas fueron de especial interés todas aquellas bandas que co-migraron en el carril de los amplicones pertenecientes a la muestra de leche de la madre y el carril de la muestra de heces de su respectivo lactante.

Estas bandas de interés se cortaron a partir del gel de poliacrilamida, y se recolectaron en un tubo de 1,5 mL debidamente rotulados, en buffer TE 1X (tris EDTA), y se dejaron difundir a 6°C por un lapso de 48 horas, para luego proceder a su re-amplificación.

4.2.6 Electro elusión de ADN a partir del gel de poliacrilamida DGGE:

Una vez cortadas y extraídas las bandas de interés a partir del gel de poliacrilamida (DGGE), estas se dispusieron en tubos de 1.5 ml con 50 µl de TE 1x.

Estas bandas se colocan en los depósitos de una cámara de electro elusión, la funciona de forma análoga a una cámara de electroforesis.

Dichos depósitos para el ADN están dispuestos de manera de que el gel cortado con la banda de interés esté del lado más cercano al ánodo (carga negativa), de manera que el ADN sea atraído fuera del gel hacia la dirección del cátodo (carga positiva).

El Tampón de corrida utilizado fue TBE a una concentración de 0,5X.

Después de una hora de corrida a 100 V, el ADN ha sido extraído por completo del gel de poliacrilamida. El ADN se recupera del lado más cercano al cátodo (figura 7) para luego proceder a su re-amplificación.

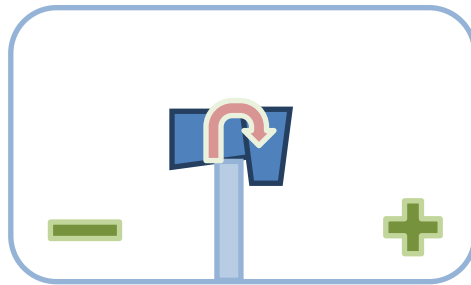


Figura 7. Esquema de una cámara de electro-elución. (-) carga negativa (+) carga positiva. La flecha señala la dirección en la que se desplaza el ADN.

4.2.7 re-amplificación del ADN eluido:

Se realizó una reacción de amplificación a las secuencias de ADN escindidas y eluidas a partir del gel de poliacrilamida, con los cebadores anidados L0159 y L0515 (sin grapa GC).

4.2.8 Secuenciación de ADN para la identificación de género y especie bacteriana:

Este paso no fue logrado. Las secuencias que pudieran ser obtenidas a partir de los amplicones secuenciados se podrán usar para realizar un análisis de complementariedad (similitud) en diferentes bases de datos con la finalidad de identificar las bacterias encontradas en las diferentes muestras.

5. Resultados:

5.1 Estandarización de las PCRs

Para las PCR se utilizaron cebadores que amplifican una región del ADN bacteriano que codifica ARN ribosomal 16S. Se realizaron estandarizaciones de los cebadores universales U968-GC (Sentido) U1401 (Anti Sentido), (Zoatendal y col, 1998). En la figura 8 se muestran los productos de la amplificación por PCR del gen rARN 16S a dos diferentes temperaturas de hibridación, empleando cebadores universales para este gen bacteriano. El producto esperado es de 473 pares de bases (pb). A Ambas temperaturas de hibridación se observaron bandas del tamaño esperado. En el panel II se muestra también el amplicón obtenido a partir de una leche materna (donante 5-M), utilizando para esto el kit (Milk Bacterial DNA Isolation Kit) de la casa comercial NORGEN, con un volumen inicial de 1 mL leche materna según las instrucciones del kit. Se observó para esta muestra una señal con una intensidad muy débil, en comparación a los carriles 2 y 3 (controles positivos), y la muestra de heces (el carril 4), lo que sugiere que la eficiencia de la amplificación a partir ADN obtenido de 1 ml de leche materna (visto cualitativamente), es baja.

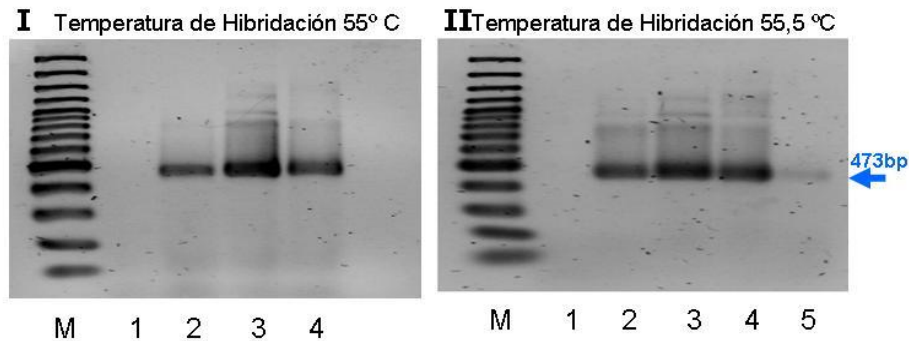


Figura 8. Detección del gen rARN 16S por PCR a dos temperaturas de hibridación, empleando cebadores universales (U968-GC - U1401). En ambos paneles I y II, Carril M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA. Carril 1: Control negativo H₂O. Carril 2: Control positivo *Lactobacillus rhamnosus*. Carril 3: Control positivo *Escherichia coli*. Carril 4: ADN obtenido de heces donante 5B. Adicionalmente sólo en el panel II, carril 5: ADN obtenido de leche humana, donante 5M.

Con el objetivo de mejorar la detección, se decidió incrementar el volumen de muestra para el aislamiento del ADN de leche a 20 mL tal como se describe en los métodos (4.2.2 Extracción de ADN). Por otro lado, se evaluó comparativamente la eficiencia de dos diferentes estuches comerciales para el aislamiento de ADN 1) Milk Bacterial DNA Isoation Kit, NORGEN y 2) Wizard Genomic DNA Purification Kit, PROMEGA. Para esto se utilizó la leche materna de la misma donante (5-M), y se realizó una PCR empleando los cebadores universales para verificar la eficiencia del aislamiento de ADN. Basándose en la intensidad de las bandas de producto de PCR se comparó la eficiencia de ambos kits de purificación de ADN a partir de muestras de leche materna (figura 9). En los carriles 4 y 5, correspondientes

a los aislados de ADN de muestras de leche 5-M (P) y 5-M (N), se observan bandas con una mayor intensidad en comparación a la obtenida en la PCR anterior (panel II carril 5, figura 8), lo que demuestra que al aumentar la cantidad inicial de leche materna para el aislado de ADN de 1 mL a 20 mL, se obtiene una mayor cantidad de producto de PCR. Adicionalmente se pudo observar que la intensidad de las bandas de los carriles 5 y 6 (aislados de ADN a partir de leche materna con los kits PROMEGA y NORGEN respectivamente) es parecida, por lo que se decidió escoger el kit de la casa comercial PROMEGA para el resto de los aislamientos de ADN a partir de leche materna

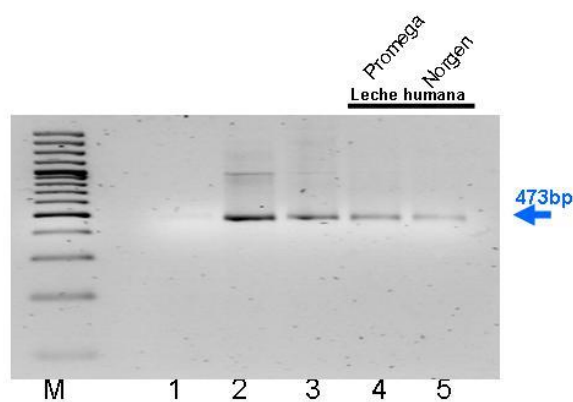


Figura 9. Detección del gen rARN 16S por PCR a partir de templados de ADN obtenidos empleando dos diferentes estuches comerciales, y cebadores universales (U968-GC - U1401). Carril M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA. Carril 1: Control negativo H₂O. Carril 2: Control positivo *Escherichia coli* Carril 3: ADN obtenido de heces donante 5B. Carril 4: Amplificación de templado ADN obtenido con estuche Promega (5M-P). Carril 5: Amplificación de templado ADN obtenido con estuche Norgen (5M-N).

Seguidamente se probaron temperaturas de hibridación más altas, tal como se presenta en la figura 10. A 56 °C (figuras 10 A, B) se logró obtener productos de PCR con menos inespecificidades), aunque aún no se logró corregir del todo. En la figura 10B, se observó una leve señal en el carril 1 (control negativo), que probablemente se deba a contaminación de la reacción. Como puede apreciarse en la figura 10 paneles C y D, a temperatura de 57°C la presencia de bandas inespecíficas fue menor. En vista de estos resultados la temperatura de hibridación escogida para las PCR con los cebadores universales (U968-GC - U1401) fue de 57°C.

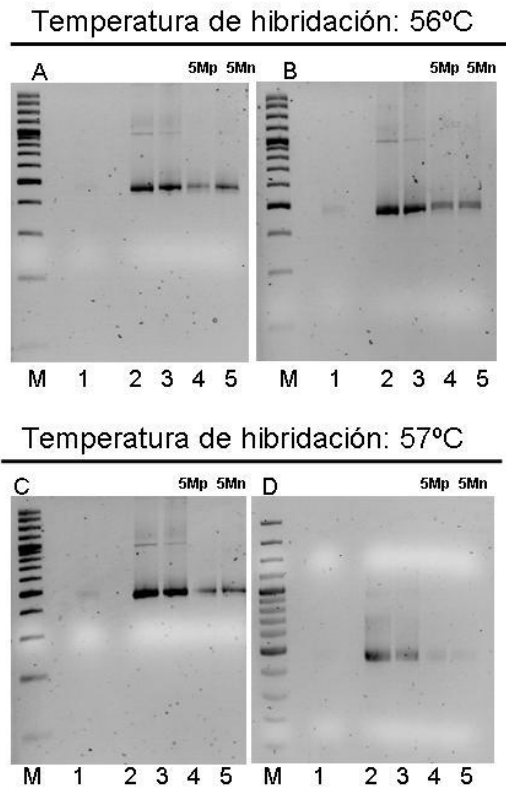


Figura 10. Detección del gen rARN 16S por PCR a dos temperaturas de hibridación, empleando cebadores universales (U968-GC - U1401). Paneles A, B y C se realizaron a 56°C. Paneles D y E se realizaron a 57°C Para todos los paneles A-E. Carril M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder INVITROGEN, carril 1: Control negativo H₂O, carril 2: Control positivo Escherichia coli. Carril 3: Muestra lactante (5 - B), carril 4: Amplificación de templado ADN obtenido con estuche Promega (5M-p). Carril 5: Amplificación de templado ADN obtenido con estuche Norgen (5M-n).

Estandarización de la nueva ADN polimerasa (KAPA Taq HotStart), kit de la casa comercial

KAPABiosystems:

Debido al cambio de ADN polimerasa usada para los experimentos, se procedió a estandarizar las PCR con el uso de este nuevo kit KAPA Taq HotStart. Usando la misma temperatura de hibridación usada hasta ahora (66°C), se realizó una curva de concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂) de 2,0; 2,5; 3,0 y 3,5 mM, para la primera ronda de PCR, correspondiente a los cebadores: **U0011 - L0677**, en este caso también se empleó el ADN aislado a partir de una muestra de heces de 5 – B. Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa al 2%. Para la segunda ronda de PCR, se realizó una curva de concentración de cloruro de magnesio de 2,0; 2,5; 3,0 y 3,5 mM, usando como ADN molde el producto de PCR de la primera ronda de PCR.

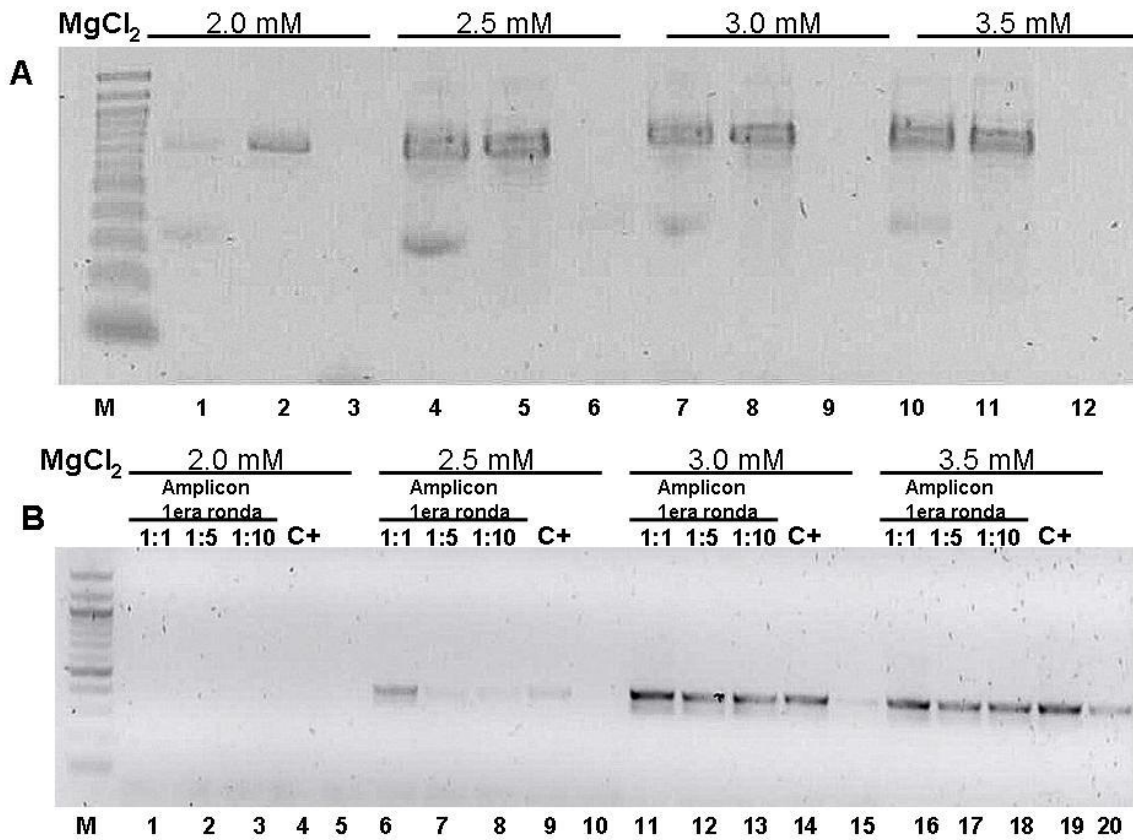


Figura 11. Determinación de la concentración final óptima de cloruro de magnesio para la primera y segunda ronda de PCR anidada, con ADN polimerasa de la casa KAPABiosystems. Panel A, primera ronda de la PCR, se emplean los cebadores U0011 - L0677. MgCl₂: carriles 1-3: 2.0 mM, carriles 4-6: 2.5 mM, carriles 7-9: 3.0 mM, carriles 10-12: 3.5 mM. Carril M: Marcador de peso molecular 100 pb, carriles 1, 4, 7 y 10: muestra de heces del lactante 5-B, carriles 2, 5, 8 y 11: control positivo *Lactobacillus rhamnosus*, carriles 3, 6, 9 y 12: control negativo H₂O. Panel B, segunda ronda de PCR anidada, se emplean los cebadores L0159 - U0515GC. MgCl₂ carriles 1-5: 2.0 mM, carriles 6-10: 2.5 mM, carriles 11-15: 3.0 mM, carriles 16-20: 3.5 mM. Carril M: Marcador de peso molecular 100 pb. En cada serie se corren diluciones del templado originado en la primera ronda de 1:1 (carriles 1, 6, 11 y 16) 1:5 (carriles 2, 7, 12, y 17) y 1:10 (carriles 3, 8, 13 y 18). El amplicon correspondiente control positivo *Lactobacillus rhamnosus* en los carriles 4, 9, 14 y 19. El control negativo H₂O en carriles 5, 10, 15 y 20.

Del análisis de los resultados de la figura 11A, se tomó para la primera ronda de PCR concentración de cloruro de magnesio de 3 mM. La temperatura de hibridación se mantuvo en 66°C, la misma usada por Heilig y colaboradores, (2002) con estos cebadores. Usando como templado el amplicon obtenido a 3mM de cloruro de magnesio de 3mM, se procedió a evaluar varias diluciones (1:1, 1:5 y 1:10), para cada concentración de cloruro de magnesio (figura 11B), con la finalidad de observar el efecto de la concentración inicial del templado en la reacción. En esta segunda ronda la temperatura de hibridación fue de 68°C. En resumen para la nueva ADN polimerasa (KAPA Taq HotStart), kit de la casa comercial KAPABiosystems, la temperatura de hibridación escogida fue de 66°C (primera ronda de PCR) y 68°C (segunda ronda de PCR). Para ambas rondas de amplificación la concentración de cloruro de magnesio escogida fue de 3 mM.

5.2 Estandarización de la PCR anidada.

Para la PCR anidada se utilizaron los cebadores **U0011** Sentido (Poulsen y Stahl, 1993) y **L0677** Anti Sentido (Heilig y col, 2002), para la primera ronda de PCR, el tamaño esperado del producto de PCR es de 666 pares de bases, en la segunda ronda de PCR se emplean los cebadores **L0159** Sentido (Heilig y col, 2002) y **U0515GC** Anti-Sentido (Lane, 1991). A este último se le adicionó una secuencia de 40 nucleótidos guaninas y citocinas en el extremo 5'. A esta secuencia se le denomina comunmente "grapa G-C": (Muyzer, de Waal y Uitterlinden, 1993), esta grapa es importante para obtener amplicones que puedan ser analizados en un DGGE. El tamaño esperado del producto de esta segunda ronda de PCR es de 396 pb. Todos los amplicones se corrieron en geles de agarosa al 2%. La

estandarización de esta PCR anidada se realizó con una muestra de ADN aislado a partir de heces del lactante de la donante 5, utilizando una temperatura de hibridación (66°C), siguiendo la metodología descrita por Heilig y colaboradores(2002). Bajo estas condiciones se procedió a efectuar una curva de concentración de cloruro de magnesio para de modo de establecer la concentración de magnesio adecuada para los estos cebadores **U0011 - L0677** en la primera ronda de PCR. Los resultados se muestran en la figura 12 donde se observan los productos de PCR del tamaño esperado. En consideración de los resultados obtenidos, se adoptó como condiciones óptimas para la primera ronda de PCR (cebadores **U0011- L0677**) la temperatura de hibridación 66°C y la concentración de magnesio de 4,5 mM. Seguidamente, se hizo uso de este amplicon obtenido como ADN molde para la siguiente ronda de PCR, empleando los cebadores anidados **L0159 - U0515GC**. En este caso también se procedió a determinar las condiciones óptimas de temperatura de hibridación y de concentración de cloruro de magnesio (figura 13).

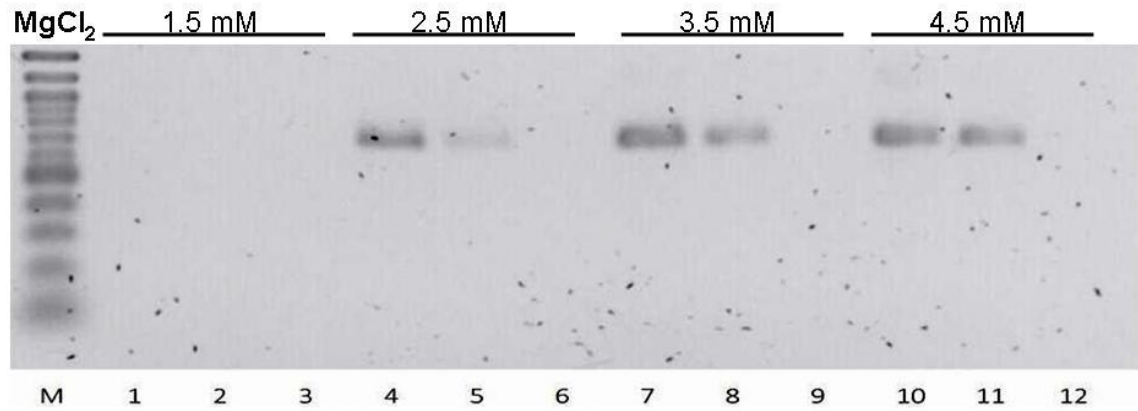


Figura 12. Determinación de la concentración final óptima de cloruro de magnesio para la primera ronda de la PCR anidada. Se emplean los cebadores U0011 - L0677. $MgCl_2$: carriles 1-3: 1.5 mM, carriles 4-6: 2.5 mM, carriles 7-9: 3.5 mM, carriles 10-12: 4.5 mM. Carril M: Marcador de peso molecular 100 pb, carriles 1, 4, 7 y 10: muestra de heces del lactante 5-B, carriles 2, 5, 8 y 11: control positivo *Lactobacillus rhamnosus*, carriles 3, 6, 9 y 12: control negativo H_2O . Tamaño esperado del amplicon 666pb

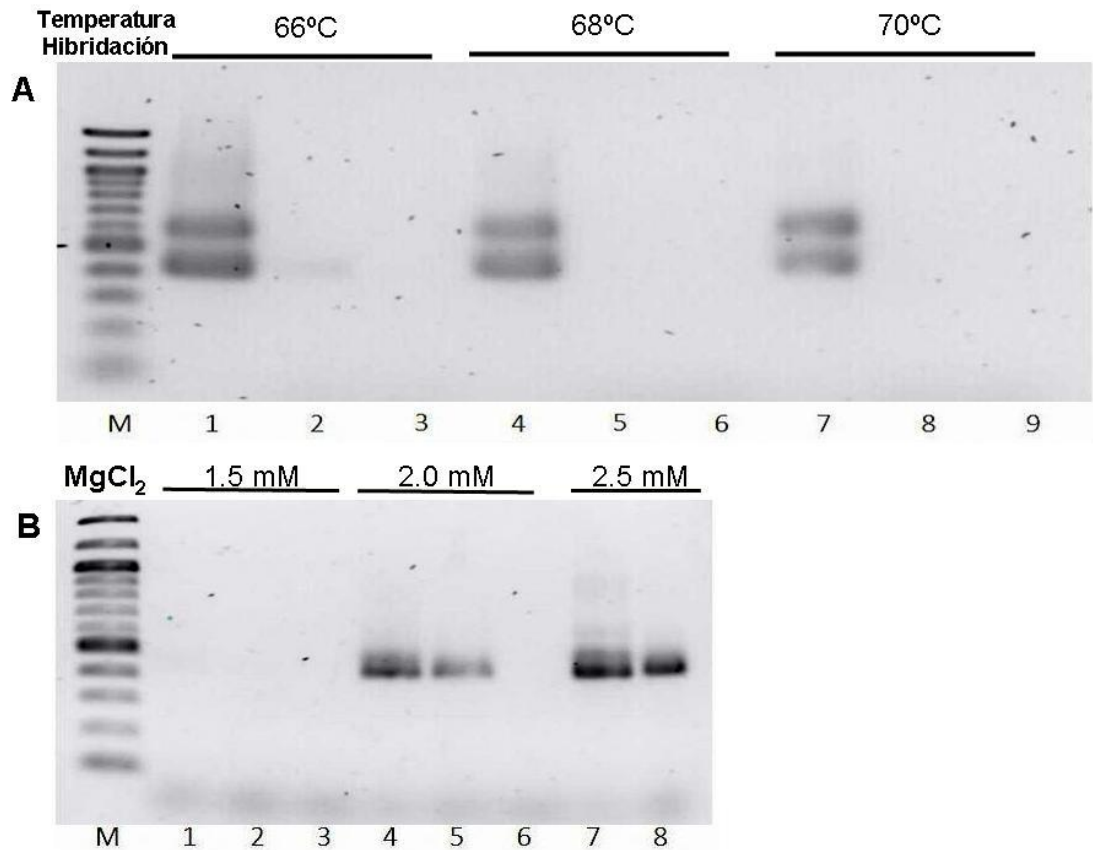


Figura 13. Determinación de las condiciones óptimas de la segunda ronda de la PCR anidada, cebadores L0159 - U0515GC. Panel A. Amplificación obtenida a cuatro diferentes temperaturas de hibridación. Carriles 1-3: 66°C, carriles 4-6: 68°C, carriles 7-9:70°C. Carril M: Marcador de peso molecular 100 pb. En cada serie se presentan los productos obtenidos a partir de muestra de heces del lactante 5 - B (carriles 1, 4 y 7), los productos obtenidos para el control positivo *Lactobacillus rhamnosus* (carriles 2, 5 y 8) y la corrida de los controles negativos, H₂O (carriles 3, 6 y 9) Panel B. Determinación de la concentración óptima de cloruro de magnesio: carriles 1-3: 1.5 mM, carriles 4-6: 2.0 mM, carriles 7-8: 2.5 mM. Carril M: Marcador de peso molecular 100 pb. Se presentan los productos obtenidos a partir de la muestra de heces del lactante 5-B en carriles 1, 4, 7. Los controles positivos de *Lactobacillus rhamnosus* en: carriles 2, 5, 8. Los controles negativos en los carriles 3 y 6. Tamaño esperado del amplicón específico es de 396 pb.

En la figura 13A se observó una doble banda, una del tamaño esperado y otra de mayor tamaño. Además no se obtuvo amplificado para la condición del control positivo. A

pesar de esto se eligió usar la temperatura de hibridación de 68°C y proceder con la estandarización de la concentración de cloruro de magnesio. (Figura 13B). Con este resultado se determinó que la concentración óptima es de 2 mM. En resumen, las condiciones de PCR anidada se establecieron como primera ronda de PCR: temperatura de hibridación 66°C y $[MgCl_2]= 4.5$ mM. Segunda ronda de PCR: temperatura de hibridación 68°C y $[MgCl_2]= 2.0$ mM.

5.3 Estandarización del DGGE:

Con el objetivo de estandarizar la técnica de DGGE se realizó una corrida en un gel al 6 % acrilamida/bisacrilamida en condiciones desnaturalizantes con un gradiente de 0% al 100% de Urea. Para cada carril se cargaron 10 μ L de producto de PCR de los experimentos independientes bajo las condiciones descritas en la figura 10, correspondientes a las muestras del par madre (5-M) y lactante (5-B).

Debido a que la radiación con luz UV necesaria para visualizar las bandas (previamente teñidas con SYBR Green), provoca dímeros de timina que entorpecen la replicación normal del ADN y por ende la reacción de PCR (klug, Cummings y Spencer, 2006), se decidió iluminar con UV sólo el tiempo necesario para cortar y extraer las bandas de interés a partir del gel sin arriesgar su integridad, prescindiendo de la fotodocumentación, por lo que la imagen del gel (DGGE) no se muestra.

Es importante mencionar que las bandas señaladas como de interés son todas aquellas que hayan sido correctamente resueltas y sean fácilmente visibles en el gel, con énfasis en las secuencias co-migrantes.

A continuación se muestra un esquema de cómo se cargaron las muestras el gel para el DGGE y las bandas escindidas una vez finalizada la corrida (figura 14).

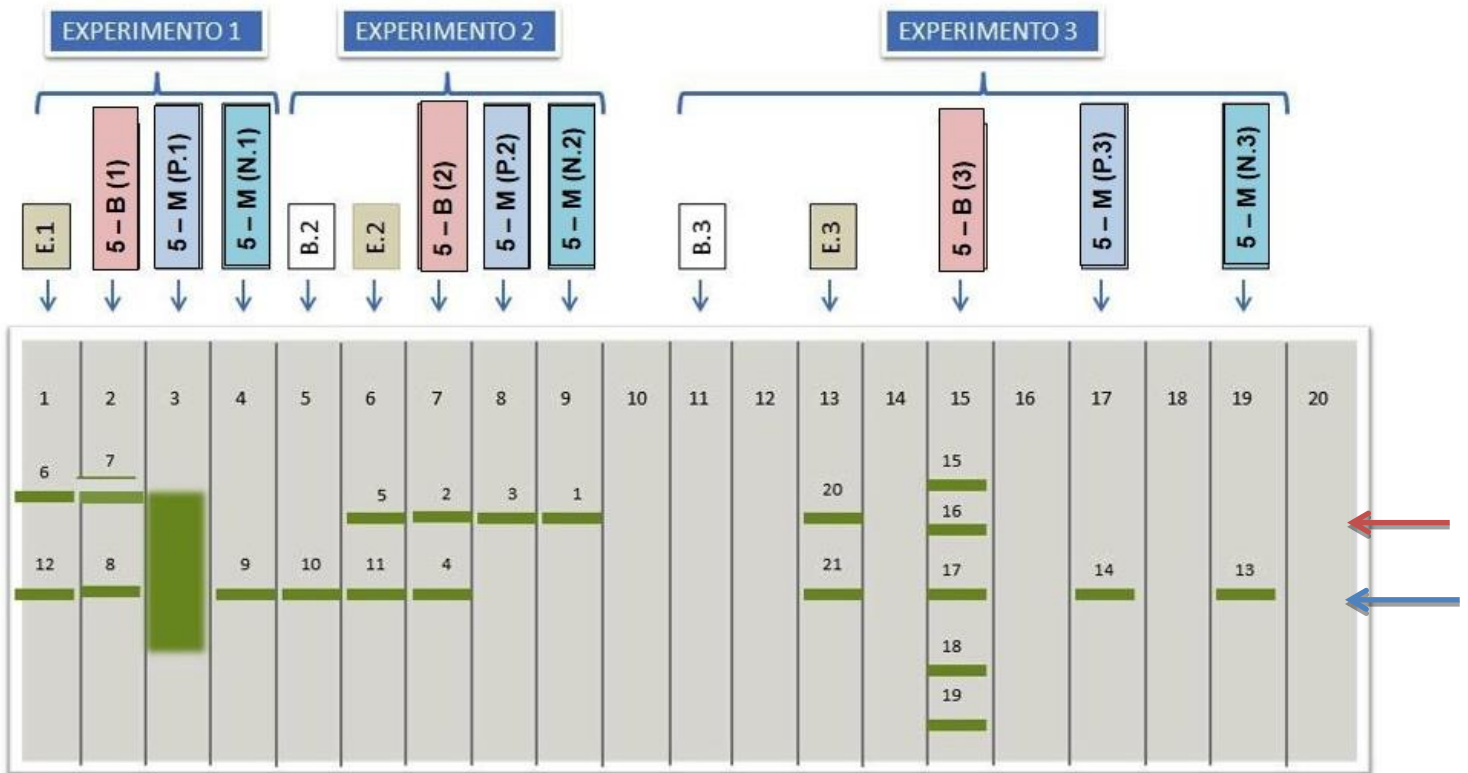


Figura 14. Esquema del gel de DGGE. Carriles 1, 6 y 13 (producto de PCR del control positivo, *E. coli*), carriles 2, 7, y 15 (producto de PCR de la muestra del lactante 5 – B), carriles 3, 8, y 17 (productos de PCR de las muestras de leche materna 5 – M, correspondiente al kit de aislamiento de ADN (kit PROMEGA), carriles 4, 9 y 19 (productos de PCR de las muestras de leche materna 5 – M, correspondiente al kit de aislamiento de ADN (kit NORGEN). La numeración corresponde a la separación por experimento: 1, 2 y 3 (figura 11A,B, y C respectivamente). Las líneas verdes muestran esquemáticamente las posiciones de las bandas que fueron escindidas. En el carril 3 se observó un barrido, por lo que no se cortó ninguna banda. Las flechas azules y rojas señalan las bandas que co-migran con las bandas de control positivo (carriles 1, 6 y 13).

Para tener una banda patrón en el DGGE, se cargaron muestras de producto de PCR a partir de aislados de ADN de colonias de *E. coli* (**E**), en los carriles 1, 6 y 13. Para este templado se obtuvieron 2 bandas correspondientes a dos secuencias diferentes del mismo tamaño (473 pares de bases), lo que sugiere la existencia de dos cepas de *E. coli* en este aislado, y que a su vez co-migran con las muestras de heces del lactante **5 – B**, de los tres experimentos, carriles 2, 7 y 15 (flechas azules y rojas).

Para los productos de PCR del experimento 1, se pudo observar bandas co-migrantes (flecha azul) entre las muestras del lactante **5 – B (1)** y muestras de leche materna de la madre **5 - M (N.1)**, carriles 2 y 4 respectivamente y que a su vez migran al mismo nivel en el gel con una de las bandas detectada en la muestra del carril 1 muestra patrón **E.1**.

En el experimento 3 podemos observar el mismo patrón de corrida en comparación al experimento 1 (flecha azul), carril 13: **E.3**, carril 15: **5 – B (3)**, carril 17: **5 – M (P.3)** y carril 19: **5 – M (N.3)**, lo que sugiere la presencia de *E. coli* tanto en leche materna como en heces del lactante.

Cuando analizamos la corrida del experimento 2, en los carriles 6 y 7 (**E** y **5 – B** respectivamente) no se observan cambios con respecto a los experimentos réplicas 1 y 3 (flechas azules y rojas). En contraposición, las muestras de leche materna (carriles 8 y 9, flecha roja), exhiben un patrón de migración totalmente diferente con respecto a las mismas muestras de los experimentos 1 y 3 (carriles: 4, 17 y 19). Se debe destacar que para el caso de las muestras **5 – B**, correspondiente a los experimentos 1 y 2, solo se obtuvieron

dos bandas, en comparación al carril 15: **5 – B** (3), donde se obtienen una mayor cantidad de bandas (5 en total), lo que podría esperarse tomando en cuenta que se trata de una muestra de heces, la cual es una referencia de la microbiota intestinal del lactante.

Con la finalidad de indagar acerca de la aparición de una banda de tamaño esperado en el carril del control negativo (figura 10B), se corrió esta junto con otra muestra de control negativo sin señal (figura 10A), carriles 5 y 11 respectivamente. Se observa entonces una banda (carril 5) que co-migra con las bandas del control positivo (flechas azules, figura 14), lo cual hace presumir de una contaminación que fue detectada con el uso de los cebadores universales U968-GC - U1401, los cuales poseen una gran sensibilidad a la existencia de ADN de cualquier organismo bacteriano.

Extracción de ADN a partir de bandas escindidas de un gel de poliacrilamida (DGGE):

Las bandas escindidas (figura 14), fueron eluidas del gel de poliacrilamida (4.2.5 Extracción y elusión de ADN a partir del gel de poliacrilamida DGGE). Los códigos de las muestras eluidas se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Códigos de las bandas escindidas a partir del gel de DGGE, por experimento y por muestra. B (control negativo de las PCR), E (control positivo de las PCR), 5 – B (amplicon a partir del aislado de ADN de muestras de heces del lactante), 5 – M (P) (amplicon de ADN aislado a partir de leche materna con el kit de la casa comercial PROMEGA), 5 – M (N) (amplicon de ADN aislado a partir de leche materna con el kit de la casa comercial NORGEN).

# DE BANDA ESCINDIDA POR MUESTRA A PARTIR DEL GEL DE DGGE					
MUESTRA	B	E (<i>E.coli</i>)	5 – B	5 – M (P)	5 – M (N)
Experimento 1	=====	6, 12	7, 8	=====	9
Experimento 2	10	5, 11	2, 4	3	1
Experimento 3	=====	20, 21	15, 16, 17, 18, 19	14	13

En la figura 15, se observa la re-amplificación de las bandas electro eluidas, se realizó una PCR usando los cebadores universales U968 (cebadorU968-GC sin la grapa GC) y U1401, con el fin de verificar si el ADN podía ser re-amplificado exitosamente, paso importante para su posterior secuenciación.

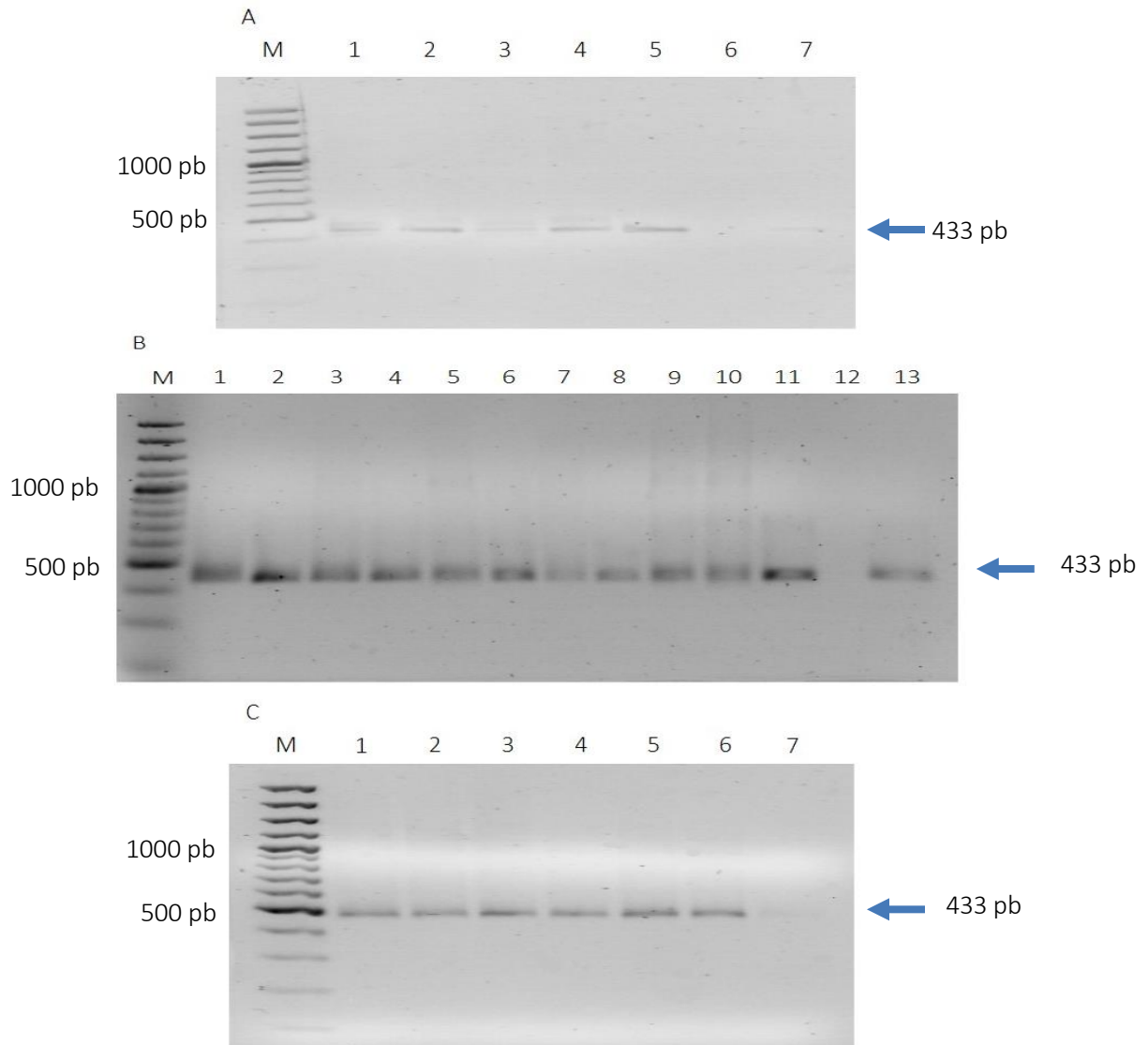


Figura 15: Re-amplificados de las bandas escindidas a partir del gel de DGGE con cebadores universales (U968 - U1401). Panel A(carril M:Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder INVITROGEN, carriles 1 al 5: re-amplificados del 1 al 5, carril 6: control negativo: H₂O,carril 7: control positivo *Escherichia coli.*), Panel B (carril M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder INVITROGEN. carriles 1 al 11: re-amplificados del 6 al 16, carril 12: control negativo H₂O, carril 13: control positivo *Escherichia coli.*), Panel C (carril M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder INVITROGEN. carriles 1 al 5: re-amplificados del 17 al 21, carril 6: control negativo: H₂O, carril 7: control positivo *Escherichia coli.*). Códigos de las muestras en la Tabla 4. Tamaño de producto de PCR esperado 433.

5.4 Estandarización Electro Elusión:

Con el objeto de acotar la detección de especies bacterianas al orden de lactobacillales, se emplearon cebadores específicos para este orden de bacterias. Se realizó una PCR anidada según se describe en el punto 4.2.3. En la figura 16 se muestra una corrida DGGE de tres productos de diferentes PCR anidadas, empleando un templado control correspondiente a *Lactobacillus rhamnosus*.

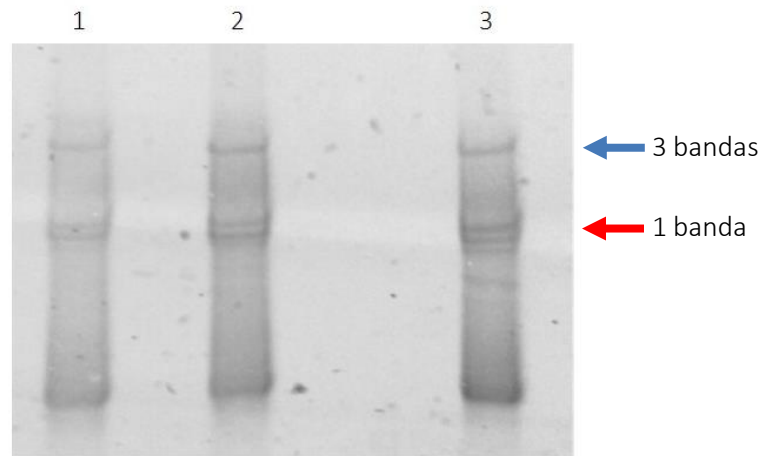


Figura 16. Perfil de bandas en corrida DGGE (30-80% urea), de productos de PCR anidada. Carril 1, 2 y 3: amplicones de control positivo (*Lactobacillus rhamnosus*), de tres diferentes PCR anidadas. Se escindieron 3 bandas co- migrantes (flecha azul), de los carriles 1, 2 y 3 (L.1, L.2, L.3 respectivamente), otra banda (L.4) correspondiente al carril 3 (flecha roja), y un segmento de gel (B): gel sin ADN (control negativo).

Se obtuvo un patrón de bandas muy similar para las tres muestras corridas (figura 16, carriles 1, 2 y 3). Este resultado es coherente tomando en cuenta que se trata de distintos productos de PCR con una misma muestra (aislado de ADN a partir de un liofilizado de *Lactobacillus rhamnosus*). Se escindieron 4 bandas y un control negativo a

partir del gel de DGGE, tal como se muestra en la figura 16, y se procedió a eluir el ADN con una técnica de electro-elusión, (4.2.6 Electro elusión de ADN a partir del gel de poliacrilamida DGGE).

Posteriormente, se procedió a realizar una PCR del ADN eluido, usando los cebadores **L0159 - U0515** (figura 17). El tamaño esperado para el amplicon es de 356 pb.

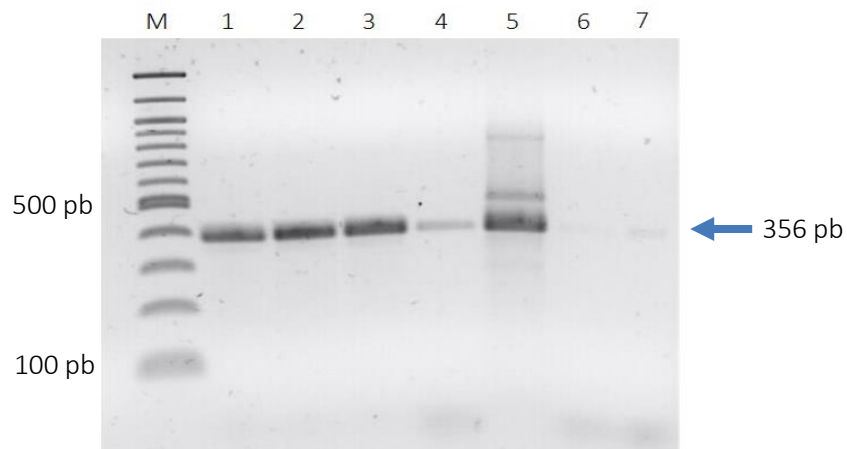


Figura 17. Re-amplificados de las bandas electro eluidas a partir del gel de DGGE empleando cebadores específicos (L0159 - U0515). Carril M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder, carriles 1, 2 y 3: bandas escindidas *L.1*, *L.2*, *L.3*, carril 4: banda escindida *L.4*, carril 5: Control positivo DNA genómico de *Lactobacillus rhamnosus*, carril 6: Control negativo correspondiente a una banda escindida sin ADN (B), carril 7: Control negativo correspondiente al buffer de corrida de la cámara de electro-elusión (BF).

Se obtuvieron amplicones para todas las muestras (Figura 17, bandas escindidas *L.1*, *L.2*, *L.3*, *L.4*), Lo que indica el ADN eluido a partir de bandas escindidas de un gel de poliacrilamida (DGGE), mediante el uso de un campo eléctrico similar al usado en

electroforesis en geles de agarosa fue exitoso. Para L.4 se obtuvo una señal considerablemente menor, lo que posiblemente se deba a que se trata de una banda con menos afinidad por los cebadores **L0159 - U0515**, en comparación con L.1, L.2 y L.3. Para el carril (B) en el que se esperaría una ausencia absoluta de señal, se puede apreciar una leve señal, y otra un poco más intensa en el carril (BF), lo que sugiere la existencia de una pequeña contaminación en el buffer de corrida para la electro-elusión, cuya fuente podría deberse al contacto del ADN eluido a partir de las bandas con producto de PCR con el buffer de corrida.

5.5 Detección molecular de bacterias en muestras pareadas de leche materna y heces de lactante.

En la figura 18 se presentan los productos de amplificación con cebadores universales U968-GC (Sentido) U1401 (Anti Sentido), (Zoatendal y col, 1998), se evaluaron los pares donantes 1 al 4, y del 6 al 9, en esta ronda de experimentos no se incluyó el par donante 5, por haber sido amplificado en la estandarización de los cebadores. Se obtuvieron productos de PCR para todas las muestras amplificadas (paneles A y B). Este resultado confirma la existencia de ADN bacteriano en muestras de leche materna, la amplificación también resultó exitosa para las muestras de heces (paneles C y D). Seguidamente se procedió a utilizar sobre el mismo conjunto de templados, un par de cebadores específicos para el género de los *Lactobacillus* (L0159 - L0677), diseñados por Heilig y colaboradores, (2002) con una modificación en el cebador L0159 (sentido), al que se le adicionó una “grapa GC” tal como se describe en el punto 4.2.4 Análisis por

electroforesis DGGE, esta grapa es imprescindible para posteriormente hacer las corridas en un DGGE, y que consiste en una secuencia en el extremo 5' enriquecida en G-C (40 nucleótidos entre guaninas y citocinas): (Muyzer, De Waal y Uitterlinden, 1993), en este caso el tamaño esperado para estos amplicones es de 558 pb. En esta figura se puede observar que todas las muestras de leche humana en estudio (Figura 19A y 19B), mostraron amplicones consistentes con la presencia de lactobacilos. También se observó el amplicon de lactobacilos en cada muestra pareada de heces de sus lactantes (figuras 19C y 19D). Cabe señalar la diferencia entre donantes en relación a la intensidad de la bandas en el gel, sugiriendo la variabilidad en la cuenta de bacterias lactobacilos entre muestras de leche humana.

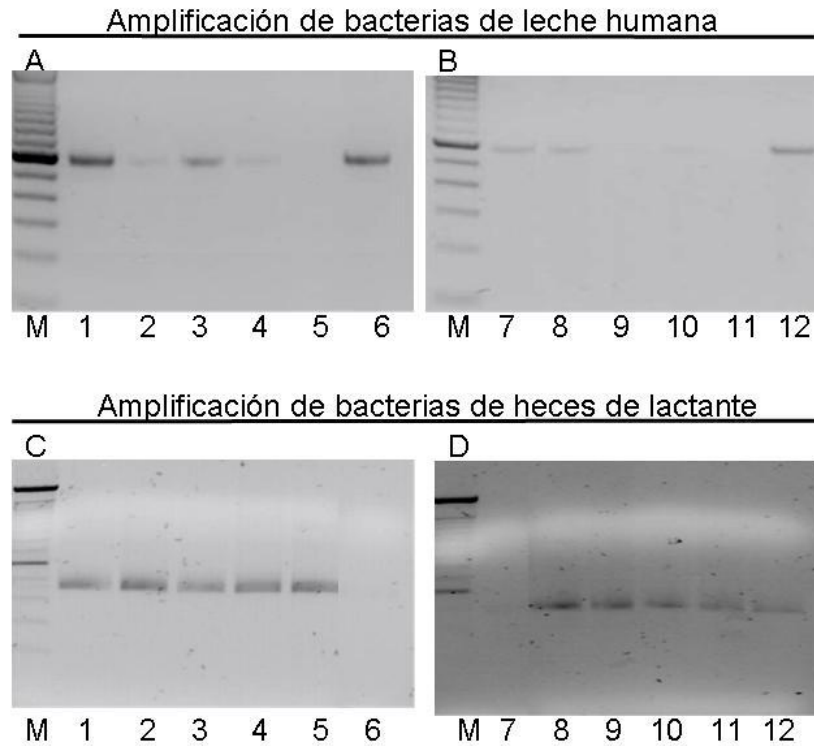


Figura 18. Detección por PCR, del gen rARN 16S, empleando cebadores universales (U968-GC - U1401) en ocho muestras del estudio. Paneles A y B amplicones obtenidos en leche materna. Carriles M: Marcador de peso molecular 100 pb, carriles 1 al 4 (panel A) y 7 al 10 (panel B): muestras de leche materna, carriles 5 y 11: control negativo H₂O, carriles 6 y 12: control positivo *Escherichia coli*. Panel C y D amplicones obtenidos en heces de lactantes. Carriles M: Marcador de peso molecular 100 pb, carriles 1 al 4 (panel C) y 8 al 11 (panel D): muestras de heces de lactantes, carriles 6 y 7: control negativo H₂O, carriles 5 y 12: control positivo *Escherichia coli*. Tamaño de producto de PCR esperado 473.

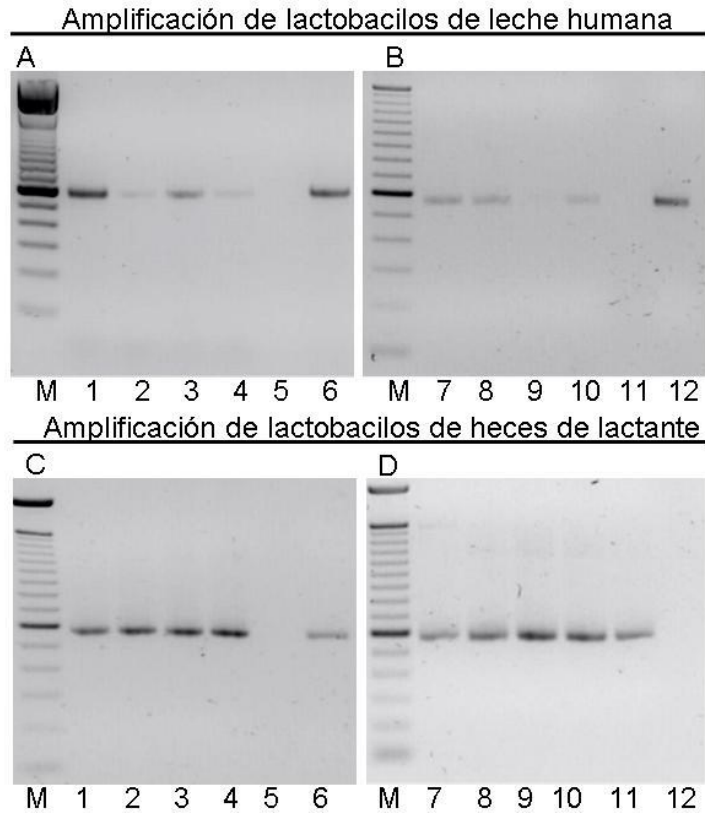


Figura 19. Detección por PCR, del gen rARN 16S, empleando cebadores específicos para lactobacilos (L0159-GC - L0677) en ocho muestras del estudio. Paneles A y B amplicones obtenidos en leche materna. Carriles M: Marcador de peso molecular 100 pb, carriles 1 al 4 (panel A) y 7 al 9 (panel B): ADN de muestras de leche materna, carriles 5 y 11: control negativo H₂O, carriles 6 y 12: control positivo *Escherichia coli*. Panel C y D amplicones obtenidos en heces de lactantes. Carriles M: Marcador de peso molecular 100 pb, carriles 1 al 4 (panel C) y 8 al 11 (panel D): muestras de heces de lactantes, carriles 5 y 12: control negativo H₂O, carriles 6 y 7: control positivo *Escherichia coli*. Tamaño de producto de PCR esperado 558

5.6 Análisis de los segmentos amplificados del gen rARN 16S por DGGE empleando cebadores para lactobacilos.

Fueron realizadas varias corridas de DGGE con productos de PCR como los presentados en las figuras 16A, B, C y D con los cebadores específicos para lactobacilos (L0159-GC - L0677). Los resultados no fueron satisfactorios, y en todos los DGGE realizados con productos de PCR llevadas a cabo con los cebadores (L0159-GC - L0677), se obtienen resultados similares al al presentado en la figura 20.

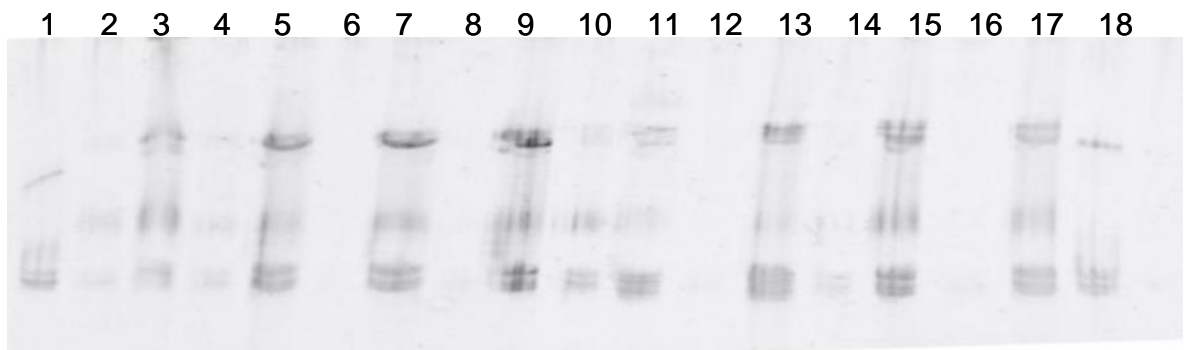


Figura 20. Análisis de los productos de PCR específica para lactobacillus en DGGE con gradiente de urea de 30% a 80%. Carriles 1 y 18: Amplicones de control positivo (*Lactobacillus rhamnosus*), carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16: amplicones obtenidos a partir de leche materna. Carriles 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17: amplicones obtenidos a partir de heces de lactantes. Muestras pareadas donantes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, y 9.

En vista de la pobre detección de bandas en los carriles correspondientes a leche humana y a la deficiente resolución de los productos de PCR con cebadores específicos para *Lactobacillus* corridos en el DGGE (figura 20), se realizó una revisión bibliográfica sobre los oligonucleótidos usados hasta ahora, y se decidió utilizar una PCR anidada según

la metodología utilizada por Heilig y colaboradores (2002), con el objeto de enriquecer los amplicones de la leche.

5.7 Detección molecular de bacterias en muestras pareadas de leche materna y heces de lactante por la estrategia de la PCR anidada

Se realizaron las reacciones de PCR con la totalidad de los pares donantes, incluyendo la muestra de heces de la madre donante 2 (figura 21). Esta estrategia emplea cebadores específicos para microorganismos del género de los *Lactobacillus*, logrando la detección de este género en 10 de las 12 muestras en estudio y en la totalidad de las muestras de heces evaluadas (figura 21). De un total de 12 pares de muestras (n= 12), la detección de *Lactobacillus* en 10 de ellas, equivale a un 83.3% de muestras positivas para este género. Adicionalmente, se observó un amplicón del tamaño esperado (396 pb) para *Lactobacillus* en el análisis de la muestra de heces de la madre donante Nro. 2. Estos resultados demuestran la existencia de bacterias del género de los *Lactobacillus* en heces de la madre del niño, su leche y las heces del lactante.

Además del amplicón de tamaño 396 pb, en muchas de las muestras en estudio y también en los controles positivos, se obtuvo una segunda banda de alrededor de 600 pb.

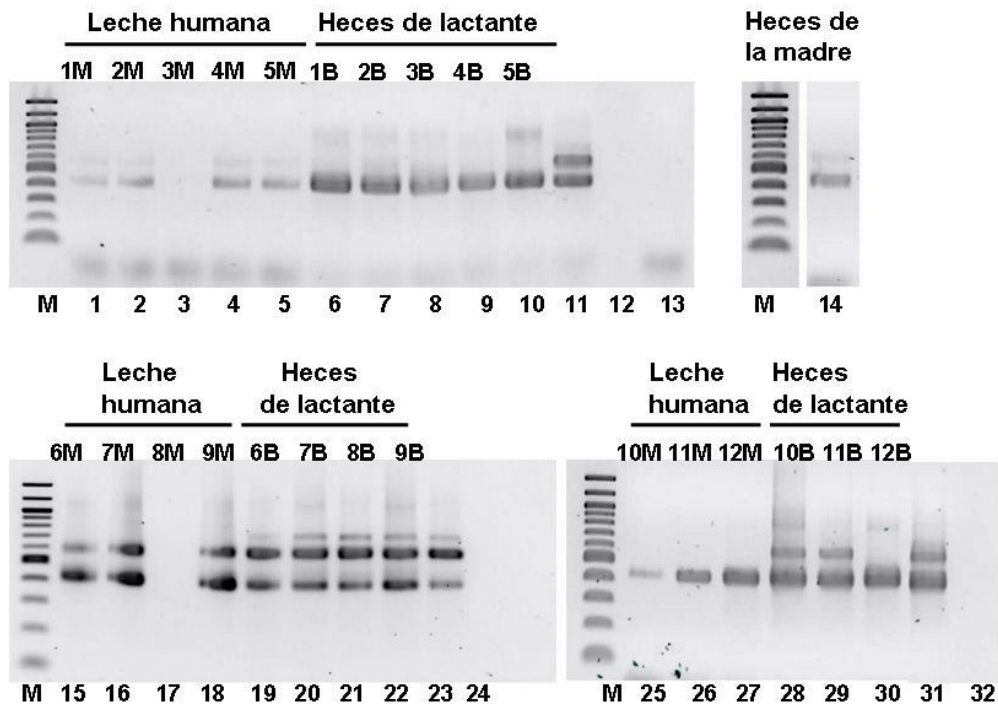


Figura 21. Detección por PCR anidada, de segmento del gen rARN 16S, empleando cebadores específicos para lactobacilos en doce muestras pareadas del estudio. Se procesaron simultáneamente la muestra de ADN de leche de la madre y la muestra de ADN de heces del lactante correspondiente. Carriles M: Marcador de peso molecular 100 pb, Muestras de leche materna: carriles 1 al 5, 15 al 18 y 25 al 27. Muestras de heces de los lactantes: carriles 6 al 10, 19 al 22 y 28 al 30. Control positivo *Lactobacillus rhamnosus* carriles 11, 23 y 31. Control negativo H₂O: carriles 13, 24 y 32. El carril 14 corresponde al análisis de una muestra de heces de la donante 2.

5.8 Análisis de los segmentos amplificados del gen rARN 16S por DGGE empleando la estrategia de la PCR anidada

Algunos de los productos de PCR de los pares madre e hijo Nros 2, 4 y 5 fueron amplificados exitosamente y corridos en un DGGE (figura 22). En esta figura se observa una banda común que co-migra entre muestras pareadas en estudio, y estas a su vez coinciden con la banda perteneciente al control positivo (*Lactobacillus rhamnosus*), en el carril 7. Esto demuestra que efectivamente existe ADN de bacterias del género de los *Lactobacillus*, en la leche materna que conforma parte de la microbiota del bebé (muestras de heces) en lactancia exclusiva.

Desafortunadamente, no se obtuvo a partir de las bandas escindidas y reamplificadas, cantidad suficiente para efectuar la secuenciación. Además, las siguientes corridas por DGGE de las otras muestras en estudio no resultaron en perfiles aceptables para su procesamiento. A pesar de volver repetidamente a la optimización de las condiciones de la amplificación, nunca se pudo obtener una corrida suficientemente limpia para escindir las bandas para su secuenciación.

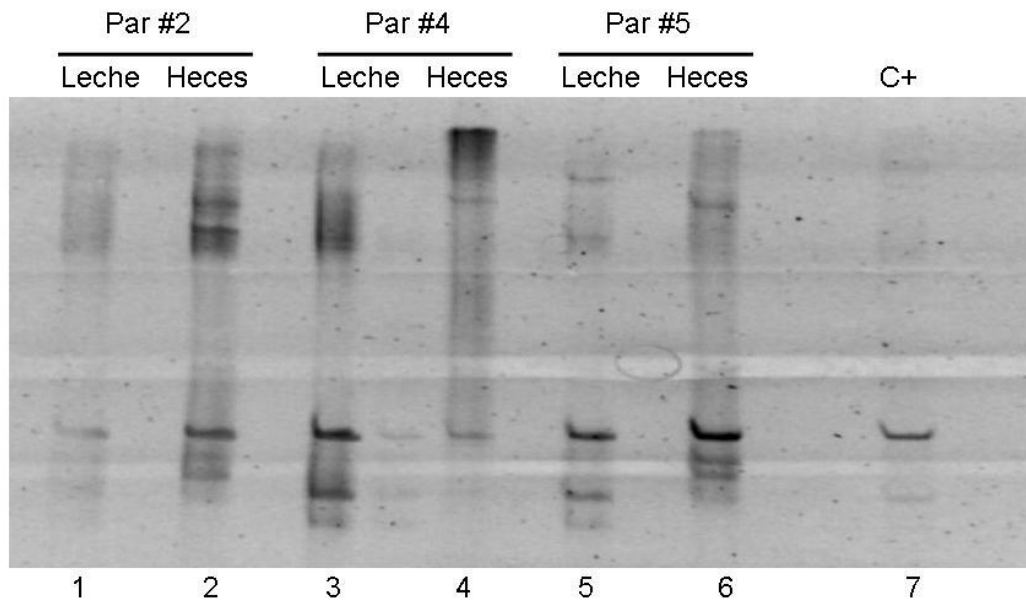


Figura 22. Análisis de los productos de PCR anidada en DGGG con gradiente de urea de 30% a 80%. Amplicones obtenidos a partir de leche materna: carriles 1, 3 y 5. Amplicones obtenidos a partir de heces de lactantes, carriles 2, 4 y 6. Control positivo *Lactobacillus rhamnosus*, carril 7. Las muestras corresponden a los pares de muestra madre e hijo Números 2, 4 y 5.

6 Discusión:

Al evaluar la composición microbiana de una muestra con métodos dependientes de cultivo se corre el riesgo de cometer errores de identificación, esto es debido a que al utilizar métodos de enriquecimiento y crecimiento en medios microbiológicos, la microbiota originalmente presente en la muestra es sometida a importantes cambios adaptativos, lo que favorece que ciertas especies bacterianas con más capacidad para dominar el entorno, se seleccionen y superen a otros componentes microbianos. Por esta razón las poblaciones numéricamente menos importantes, o más sensibles a las condiciones de estrés aplicadas durante el cultivo, son difíciles de recuperar e identificar.

Una metodología cultivo-independiente de amplia aplicación y versatilidad es el DGGE, empleada en el presente trabajo. Se debe tomar en cuenta, sin embargo, que este método también tiene limitaciones 1) La extracción de ácidos nucleicos de las muestras no asegura la lisis de todos los microorganismos presentes ni la recuperación de los ácidos nucleicos intactos. Es posible que durante la purificación de los ácidos nucleicos obtenidos no se eliminen totalmente sustancias que puedan inhibir la reacción de PCR. 2) También la reacción de PCR puede introducir errores, pueden ocurrir amplificaciones preferenciales (debido a la reasociación del DNA que se usa como templado y que evita la unión de los cebadores o a la formación de moléculas quiméricas (moléculas de rADN híbridas). Una dificultad importante en la aplicación del DGGE es la formación de moléculas heteroduplex (asociación de cadenas sencillas de moléculas diferentes de DNA) durante la amplificación por PCR. Estos heteroduplex dificultan la interpretación de patrones de DGGE, estos

artefactos pueden ser reducidos utilizando en la reacción de PCR mayor fuerza iónica, aumentando las concentraciones de cebadores y disminuyendo las temperaturas de asociación y el número de ciclos de amplificación. Todos estos parámetros fueron laboriosamente ajustados a lo largo del presente trabajo.

Aunque existen reportes sobre la posibilidad de separar por DGGE secuencias que difieren en una sola base, también se ha reportado la dificultad de separar fragmentos que difieren en 2 ó 3 bases (Kisand y, Wikner, 2003). Otra limitación de esta técnica es el número máximo de bandas de DNA que puedan separarse, aunque se ha reportado la detección de poblaciones que constituyen el 1% de la comunidad por PCR-DGGE, es posible que ocurra la co-migración de fragmentos de DNA, que provocaría la subestimación de la diversidad microbiana y la dificultad para extraer secuencias para su identificación, para contrarrestar esta posibilidad en este estudio trabajamos con cebadores específicos para la familia de los *lactobacillaceae* (figura 21).

Estandarización de cebadores universales (U968-GC - U1401) y aislamiento d ADN a partir de muestras de leche materna y heces de sus respectivos lactantes:

Para la estandarización de reacciones de PCR, uno de los factores críticos en tomar en cuenta para obtener amplicones limpios y específicos es la temperatura de hibridación, la cual debe ser estandarizada empíricamente para cada par de cebadores. Es importante tener en cuenta que, al tener una temperatura de hibridación muy baja, se obtendrán segmentos no específicos del producto de ADN, causando la aparición de múltiples bandas en el gel de agarosa, y si por el contrario la temperatura de hibridación es muy alta, la

amplificación del producto deseado se reduce considerablemente debido a que la hibridación de los cebadores al ADN blanco disminuye (Rychlik, Spencer y Rhoads, 1990).

El magnesio (Mg^{2+}) es también un componente importante en la reacción de PCR, debido a que este cofactor es indispensable para la actividad de la enzima ADN polimerasa, responsable de la síntesis de ADN en la reacción de PCR. Dado que el magnesio es adicionado a la reacción como una sal de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), esta se disocia en iones de Mg^{2+} y Cl^- en el ambiente acuoso de la reacción de PCR y los iones con carga positiva del magnesio interactúan con las cargas negativas de los grupos fosfato tanto del ADN molde como de los cebadores, por lo que a concentraciones muy altas de Mg^{2+} , la interacción ADN blanco/cebador es estabilizada, inclusive cuando no son altamente complementarios, obteniéndose productos de PCR inespecíficos. Por esta razón es necesario establecer empíricamente una concentración de magnesio que por un lado permita que la enzima ADN polimerasa trabaje adecuadamente, y por otro se evite la formación de productos de PCR inespecíficos. Tomado de: http://www.babec.org/files/PCR_2012/PCR_Optimization_Student_Guide_2012.pdf (2 de marzo de 2015).

Tomando en cuenta todos estos factores, y posteriormente a una serie de reacciones de PCR, la temperatura de hibridación escogida para las PCR con los cebadores universales (U968-GC - U1401) fue de $57^{\circ}C$ (figura 10C). Se observó que al aumentar a $58^{\circ}C$ (figura 10D), las bandas de tamaño esperado tienden a desaparecer debido a que a temperaturas de hibridación son muy altas, y la cantidad de producto de PCR deseado se

reducen notablemente lo que indica que a esta temperatura, la interacción cebador ADN molde es ya muy ineficiente y por lo tanto se hace más difícil la adhesión de los cebadores con el ADN blanco (Rychlik, Spencer y Rhoads, 1990). Se obtuvieron buenos resultados con estos cebadores a una concentración de $MgCl_2$ de 1,5 mM.

Paralelamente se realizó la estandarización de los aislamientos de ADN total a partir de muestras de la donante 5 (leche materna y heces de su respectivos lactante). Para esto se realizaron reacciones de PCR con los aislados de ADN para verificar la existencia de ADN bacteriano. En el caso de las muestras de heces del lactante 5 - B, se usó el kit QIAmp DNA Stool siguiendo las instrucciones del fabricante y se obtuvo una banda de tamaño esperado de 473 pares de bases (figura 8), por lo que se no se realizaron modificaciones para este caso.

Para el aislamiento de ADN total a partir de una muestra de leche materna (donante 5 -M), usando 1 mL de la muestra según instrucciones del fabricante (Milk Bacterial DNA Isolation Kit), la banda de tamaño esperado (473 pares de bases) fue muy tenue en comparación a las bandas de control positivo y de aislado de ADN a partir de heces de su respectivo lactante (figura 8, panel II), por lo que se decidió probar con un volumen inicial de 20 mL en lugar de 1 mL. Además del kit (Milk Bacterial DNA Isoation Kit, NORGEN) se utilizó el kit (Wizard Genomic DNA Purification Kit, PROMEGA), con el objetivo de comparar la eficiencia del aislado de ADN entre estos, y determinar la metodología más idónea para el aislamiento de ADN a partir de leche materna.

Basándose en experimentos en los que se realiza la estimación de la abundancia de un taxón específico mediante la intensidad de las bandas de productos de ADN en perfiles de DGGE, y relacionándolo con la cantidad de ADN específico para ese taxón en una muestra (Nikolcheva y col, 2003; Nübel y col, 1999), que no es más que la cantidad de ADN de un microorganismo específico, amplificado mediante una reacción de PCR, se procedió a comparar la intensidad de los productos de una PCR con cebadores universales para bacterias (U968-GC - U1401) y contrastar la eficiencia de ambos kits de purificación de ADN a partir de muestras de leche materna (figura 10). En el presente trabajo, los resultados no fueron analizados mediante ningún programa informático, por lo que se dice que estos análisis se hicieron de manera cualitativa, con el solo objetivo de discernir y decidir entre dos kits diferentes de extracción de ADN. En los carriles 5 y 6, correspondientes a los aislados de ADN de muestras de leche 5-M (P) y 5-M (N) (figura 10), se observan bandas con una mayor intensidad a la obtenida en el experimento anterior (carril 5, figura 8), por lo que se determinó que al aumentar la cantidad inicial de leche materna para el aislamiento de ADN (de 1 mL a 20 mL), se obtiene una mayor cantidad de producto de PCR, dado posiblemente a una mayor concentración de ADN molde aislado a partir de las muestras de leche materna. Por otro lado, la intensidad de las bandas de los carriles 5 y 6 (aislados de ADN a partir de leche materna con los kits PROMEGA y NORGEN respectivamente) es parecida, lo que sugiere que la eficiencia de aislamiento de ADN mediante ambos kits es similar. Este resultado nos permitió escoger el kit de la casa comercial PROMEGA (más económico) para el resto de los aislamientos de ADN a partir de leche materna.

Estandarización del DGGE:

Posteriormente se utilizaron productos de PCR de 3 reacciones diferentes (figuras 10 A, B y C) correspondientes a muestras del par donante 5 para la estandarización de la técnica de DGGE (figura 14). En relación a los productos de PCR obtenidos a partir de aislados de ADN de colonias de *E. coli* que sirvieron como secuencias conocidas para ser comparadas con el perfil de corrida de las muestras, cabe señalar que se obtuvieron 2 bandas correspondientes a dos secuencias diferentes del mismo producto de PCR (473 pares de bases), lo que sugiere la existencia de al menos dos cepas de *E. coli*. Adicionalmente, se observaron bandas tanto para las muestras de leche materna como para las muestras de heces de su lactante que co-migraron con la muestra patrón lo que sugiere la presencia de *Escherichia coli* tanto en leche materna como en heces del lactante, es necesario señalar que no se descarta la posibilidad de contaminación cruzada.

A lo largo de este trabajo, se encontró diferencias encontradas entre diferentes reacciones de PCR, llevadas a cabo con las mismas condiciones experimentales, no son un evento extraño, debido a que las reacciones de PCR son procesos estocásticos en sí mismos, y estas variaciones dependientes del azar se hacen más evidentes en reacciones de PCR donde el ADN blanco se encuentra en pequeñas cantidades, obteniéndose fluctuaciones entre resultados de varias réplicas de una misma PCR (Butler y Hill, 2010).

Por otro lado, la aparente existencia de cepas de *E. coli* en muestras de leche materna observadas en el DGGE, es coherente con estudios recientes que señalan que esta bacteria podría encontrarse entre las primeras especies que colonizan el intestino neonatal

(Favier y col, 2002). La presencia de *E. coli* en leche materna ya ha sido reportada, (Martín y col, 2007; Rodríguez y col, 2008), y aunque existen cepas patógenas, otras cepas de esta especie son habitantes normales de la flora intestinal, y con funciones ecológicas relevantes en la mucosa intestinal humana (Grozdanov y col, 2004). Estas propiedades pueden resultar muy útiles para reducir la incidencia de patógenos en neonatos de alto riesgo expuestos a ambientes hospitalarios, como es el caso de la cepa *E. coli* Nissle 1917 (06:K5:H11), la cual es la base de un producto probiótico infantil ampliamente usado en Alemania y otros países del este de Europa, donde diversos estudios han reportado que su aplicación vía oral, tanto en niños nacidos a término como en prematuros, ha resultado en una reducción significativa en el número y la gravedad de infecciones infantiles (Cukrowska y col, 2002).

Después de haber realizado varias corridas de DGGE, se hizo evidente la ventaja de ir reduciendo el rango del gradiente de urea de 0 a 100% hasta llegar a 30-80% de urea, con la finalidad de lograr una mejor resolución de las bandas de ADN. Las bandas escindidas, fueron eluidas y re-amplificadas exitosamente (mediante una PCR usando los cebadores universales U968 (cebadorU968-GC sin la grapa GC) y U1401, paso importante para su posterior secuenciación.

Estandarización Electro Elusión:

Para esta estandarización se usaron 3 productos de PCR anidada pertenecientes a liofilizados de *Lactobacillus rhamnosus*, y se corrieron en un DGGE. Se obtuvo un patrón de corrida similar para las 3 muestras tal y como se esperaba, tomado en cuenta que se trata

de réplicas de la misma muestra, sin embargo cada carril mostró un perfil de corrida de 3 bandas, a pesar de tratarse de un amplicon de una muestra que solo contenía ADN perteneciente a una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*. Las razones de este resultado no se conocen. Se cortó una banda por muestra a partir del gel de poliacrilamida (flecha azul, figura 16) y una adicional para la muestra del carril 3 (flecha roja, figura 16), para un total de 4 de las bandas resueltas, y adicionalmente se cortó un pequeño segmento del gel de poliacrilamida para ser usado como control negativo. Las bandas escindidas fueron electro-eluidas (4.2.6 Electro elusión de ADN a partir del gel de poliacrilamida DGGE), y posteriormente se realizó una reacción de PCR usando los cebadores **L0159 - U0515** (figura 17). Vale destacar que para este paso el uso de cebadores sin la grapa GC (**U0515** sin grapa **GC**), es importante ya que los productos de PCR (correspondientes a las muestras de las donantes) que pudieran ser obtenidos a partir de este paso, serán usados para secuenciación, y el segmento 5' (grapa GC) ya no es necesario. Se obtuvieron amplicones de tamaño esperado (356 pb), para todas las bandas electro eluidas, lo que demuestra el éxito de la técnica para eluir ADN de bandas escindidas a partir de geles de poliacrilamida (figura 17). Para la banda L.4 (escindida del carril 3, flecha roja), se obtuvo una señal considerablemente menor en comparación con las bandas de los carriles 1, 2 y 3 (L.1, L.2, L.3 respectivamente, flecha azul). Esta diferencia se debió posiblemente a que L.4 sea una banda inespecífica a partir de la amplificación por PCR de una muestra única de *Lactobacillus rhamnosus*, que solo se hizo visible en la corrida de DGGE, y por lo tanto esta banda tenga una menor afinidad por los cebadores **L0159 - U0515**, sin embargo esto solo puede ser corroborado mediante la secuenciación.

Reacción de PCR con cebadores universales (U968-GC - U1401) de las muestras de leche materna y heces de sus respectivos lactantes:

Se realizaron amplificaciones con los cebadores universales (U968-GC - U1401), de muestras de leche materna y heces de los pares donantes 1 al 9 (figura 18), con excepción del par 5 que había sido amplificado durante la estandarización de los cebadores universales (figura 10).

Se detectó la presencia de ADN bacteriano tanto en los aislados de ADN de muestras de leche materna, como en las muestras de heces de sus respectivos lactantes para todas las muestras procesadas. Sin embargo, es importante señalar que la poca intensidad de las bandas obtenidas en las reacciones de PCR correspondientes a las muestras de leche materna (figuras 18A y 18B), se debe probablemente a la cantidad relativamente baja de ADN blanco que tiene una correlación directa con la baja concentración bacteriana contenida en leche materna, $<10^3$ UFC/ml (Pérez y col, 2014), lo cual contrasta con una mayor concentración bacteriana en muestras de heces (figuras 18C y 18D).

Este resultado sugiere la existencia de una microbiota bacteriana en la leche materna de madres sanas, y es consistente con algunos estudios que destacan la presencia de grupos bacterianos aislados a partir de leche materna entre los que se encuentran

Lactobacillus, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *staphilococcus*, *Leuconostoc* y *lactcoccus* (Donnet-Hughes y col, 2010; Heikkilä y Saris, 2003)

Se conoce que la leche materna es vital para el crecimiento de una microbiota benéfica en el intestino del recién nacido, por un lado mediante la transmisión directa de bacterias viables y por otro mediado por factores bioquímicos e inmunológicos que favorecen el establecimiento de estas. El desarrollo e integridad de estas comunidades microbianas parecen tener implicaciones muy importantes, en relación al desempeño metabólico y funcionamiento inmunológico del intestino después del destete y para toda la vida (Martin y Sela, 2013).

En la actualidad existen cada vez más evidencias que sugieren que alteraciones en la composición de la microbiota intestinal debido a hábitos alimenticios occidentales, higiene y la medicina moderna, estarían asociados a enfermedades crónicas como la obesidad (Bäckhed y col, 2005), la diabetes (Neu y col, 2010) y desordenes inmunológicos e inflamatorios (Penders y col, 2007; Round y Mazmanian, 2009; Shorter y col, 1979) y cáncer (Zhang y col, 2011).

Al momento de nacer el intestino del neonato es estéril, y el primer encuentro con organismos microbianos comienza durante el parto y por consiguiente, la primera fuente de bacterias para el intestino del recién nacido provendrá del ambiente vaginal, la piel de la madre, y las heces maternas (dada su cercanía con el orificio vaginal), por lo que el recién nacido será colonizado tanto por microorganismos intestinales como no intestinales. Estos primeros colonizadores son capaces de reducir el ambiente intestinal, preparando el

camino para bacterias entéricas y propiciando así la colonización de anaerobios que tomaran el lugar de las bacterias aerobias provenientes de ambientes externos (Morelli, 2008; Favier y col, 2002).

Los Bebés nacidos vaginalmente y a término son colonizados casi inmediatamente por anaerobios facultativos como *Lactobacillus* y *Streptococcus* y posteriormente los *Bifidobacterium* dominaran la microbiota de niños alimentados exclusivamente con leche materna (Favier y col, 2002). Con el paso de los meses y la introducción de alimentos sólidos en el periodo de destete, decrecerá el número de anaerobios facultativos y aumentará la cantidad de anaerobios como los *Bacteroides* y *Clostridium* (Magne y col, 2006; Zhang y col, 2005), por lo que el mayor cambio en la microbiota del infante, está asociada a la introducción de alimentos sólidos y el final de la lactancia (Favier y col, 2002). Las bacterias anaerobias estarían entonces entre las más abundantes, siendo las bacterias facultativas las menos abundantes (Marteu y col, 2001).

Reacción de PCR con cebadores grupo específicos para el género de los *Lactobacillus* (L0159 - L0677):

Los probióticos son bacterias benéficas que forman parte de la microbiota normal y colectivamente estas son capaces de producir nutrientes (arginina, glutamina), incrementar la producción de inmunoglobulinas secretoras (sIgA), estimular la respuesta inmune en las células de la mucosa intestinal y desplazar por competencia a bacterias patógenas. Entre las bacterias probióticas se encuentran los *Lactobacillus*, las cuales son capaces de

degradar lactosa y producir ácido láctico (Sanders, 1994), lo que incrementa la acidez en el intestino inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas, adicionalmente se ha observado que la exposición a estas bacterias tiene efectos beneficios en la prevención de enfermedades diarreicas y respiratorias (AAP, 1997).

Tomando en cuenta las propiedades probióticas de los *Lactobacillus*, además de estar entre los géneros que comúnmente se encuentran en la leche materna, se decidió utilizar un par de cebadores específicos para el género (L0159 - L0677), diseñados por Heilig y colaboradores, (2002) con una modificación en el cebador L0159 (sentido), al que se le adicionó una grapa GC imprescindible para posteriormente ser corridas en un DGGE, y que consiste en una secuencia en el extremo 5' enriquecida en G-C (40 nucleótidos entre guaninas y citocinas): (Muyzer, De Waal y Uitterlinden, 1993), por lo que los amplicones tendrán una longitud de 558 pb. Se analizaron un total de 8 pares de muestras (pares donantes 1 al 9), con excepción del par 5, la cual hasta el momento de este experimento había sido usada para estandarizaciones. Se obtuvieron productos de PCR para todas las muestras de leche materna y heces de sus respectivos lactantes, lo que demuestra la presencia de bacterias del género de los *Lactobacillus* tanto en leche materna como en heces de los infantes. Es destacable la poca cantidad de producto de PCR para las muestras de leche de las donantes 2 y 4 y para la donante 8, que pudiera deberse a la baja concentración de bacterias de este género en la leche de estas madres.

Los productos de PCR obtenidos con los cebadores género específicos (figuras 19 A, B, C y D) fueron corridos en un DGGE, pero los resultados fueron deficientes, debido a que

no se logró resolver ninguna banda (figura 20). Se realizaron varias réplicas del experimento con el mismo resultado.

En vista de estos resultados, en los que fue imposible resolver y analizar los productos de PCR con los cebadores específicos para el género de los *Lactobacillus* (L0159 - L0677), se realizó una revisión bibliográfica y se decidió utilizar la metodología del grupo de Heilig y colaboradores (2002), en la que se usan estos mismos cebadores diseñados por ellos, pero adicionando dos cebadores universales en una PCR anidada.

Estandarización de la reacción de PCR anidada con cebadores grupo específicos para el género de los *Lactobacillus*:

Para la PCR anidada se utilizaron los cebadores U0011 Sentido (Poulsen y Stahl, 1993) y L0677 Anti Sentido (Heilig y col, 2002), para la primera ronda de PCR, con un tamaño de producto de PCR esperado de 666 pares de bases, y una segunda ronda de PCR con los cebadores L0159 Sentido (Heilig y col, 2002) y U0515GC Anti-Sentido (Lane, 1991). A este último se le adicionó una secuencia en el extremo 5' enriquecida en G-C (40 nucleótidos entre guaninas y citocinas): (Muyzer, de Waal y Uitterlinden, 1993), a la que se le denomina grapa GC, la cual es importante para obtener amplicones que puedan ser analizados en un DGGE, por lo que el tamaño esperado de estos productos de PCR es de 396 pb.

Se realizó entonces una estandarización de la PCR anidada con los nuevos cebadores, usando la ADN polimerasa Taq Platinum® de la casa comercial INVITROGEN,

teniendo como temperatura optima de hibridación 66°C para la primera ronda de PCR y una concentración de cloruro de magnesio de 4.5 mM, para la segunda ronda de PCR una temperatura optima de hibridación 68°C y una concentración de cloruro de magnesio de 2.0 mM (tabla 6). Con estas condiciones de PCR se llevó a cabo la amplificación de las muestras de leche materna y heces de los pares donantes 1 al 5 (figura 34), y a partir de estos productos se realizó una corrida de DGGE (figura 21). Debido a que se cambió la ADN polimerasa usada por la taq polimerasa (KAPA Taq HotStartBiosystems), se realizó una estandarización con la cual se establecieron las mismas temperaturas de hibridación que con la Taq Platinum®, 66°C y 68°C para la primera y segunda ronda de PCR respectivamente (tabla 6), y haciendo referencia a los resultados de las figuras 11 A y B, las concentraciones de cloruro de magnesio fueron cambiadas para quedar en 3.0 mM para ambas rondas de PCR.

Con estas condiciones de temperatura y concentración de MgCl₂ se realizaron las reacciones de PCR anidada del resto de las muestras de leche materna y heces de los respectivos lactantes de las donantes 6 al 12, y la muestra de heces de la donante 2 (figura 21).

Los productos de PCR obtenidos a partir del cambio de ADN polimerasa fueron corridos en un DGGE, pero los resultados no fueron satisfactorios, dado que se obtuvieron perfiles de corrida ilegibles (barridos) y por esta razón se procedió a realizar una nueva estandarización con el propósito de poder obtener productos de PCR que pudieran ser resueltos en un DGGE, sin embargo el resultado del DGGE fue igualmente ineficiente a pesar de haberse repetido una tercera estandarización (tabla 6).

Tabla 6. Diferentes condiciones para la PCR anidada.

Estandarización temperatura optima de hibridación y concentración de MgCl ₂					
cebadores	Según (Heilig y col, 2002)	<i>Taq Platinum</i> [®]	1° KAPA Taq HotStart	2° KAPA Taq HotStart	3° KAPA Taq HotStart
U0011- L0677	66°C	66°C	66°C	58°C	62°C
	3 mM	4.5 mM	3 mM	3 mM	1.5 mM
L0159- U0515GC	66°C	68°C	68°C	70°C	70°C
	3 mM	2 mM	3mM	1.5 mM	1.5 mM

Reacción de PCR anidada con cebadores grupo específicos para el género de los *Lactobacillus*:

Se detectaron bacterias del género de los *Lactobacillus* para la mayoría de las muestras de leche materna, a excepción de la muestras de leche 3 – M y 8 – M (figura 21). Esto demuestra que de un total de 12 muestras de leche materna (n= 12), se detectaron *Lactobacillus* en 10 de ellas, lo que equivale a un 83.3% de muestras positivas para este género.

Por otro lado, para las muestras de heces de los lactantes de dichas donantes, se detectaron *Lactobacillus* en un 100%. Aunque para nuestro estudio, la muestra fue relativamente pequeña (n=12), es interesante contrastar este resultado con el obtenido por otro grupo de investigadores en un estudio realizado a 112 lactantes suecos, de los cuales 74% poseía bacterias de este género en su microbiota (Ahrné y col, 2005). La discrepancia entre muestras de leche materna negativas para *Lactobacillus* (donantes 3 y 8) y muestras de heces de sus lactantes con señal positiva, pudo deberse por un lado a la baja cantidad de bacterias de este grupo en las muestras de leche y problemas que de esto se desprende al momento de aislar ADN a partir de dichas muestras, aunque también existe la posibilidad de que estas madres no tuvieran bacterias del género de los *Lactobacillus* en su leche. Existe la posibilidad que los *Lactobacillus* encontrados en las heces de los lactantes pudieran haber llegado al intestino de estos infantes por una vía distinta a la lactancia, pues al haber tenido parto natural, los primeros colonizadores del intestino de los recién nacidos

son anaerobios facultativos, como *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Martin, y Sela, 20012), provenientes del ambiente vaginal de la madre.

Una mención especial merecen las muestras de la donante 2, dado que se obtuvieron amplicones para la muestra de leche materna (**2 – M**), muestra de heces de su respectivo lactante (**2 – B**) y heces de la madre como tal (**2 – H**), lo que demuestra la existencia de bacterias del genero de los *Lactobacillus* para estas tres muestras. Estos resultados podrían demostrar que efectivamente existen bacterias del género de los *Lactobacillus* en la leche materna provenientes de la microbiota de la madre, y a través de la lactancia esta podría estar influenciando la microbiota de su lactante.

Estos observaciones no son concluyentes, ya que no se pudieron obtener las secuencias que permitieran corroborar la identidad de los productos de PCR presentados, sin embargo estas nos llevan a preguntarnos si efectivamente hay un mecanismo fisiológico responsable de la existencia de bacterias viables en la leche materna, las cuales podrían tener su origen en la misma microbiota de la madre y por ende ser la propia lactancia la vía mediante la cual estas bacterias terminen siendo parte de la microbiota del intestino neonatal, lo cual es consistente con la hipótesis de la ruta entero-mamaria, la cual propone que los microorganismos comensales encontrados en la leche materna tienen su origen en la misma microbiota del intestino materno y estos terminarían influenciando, mediante la lactancia, la microbiota intestinal del lactante (Donnet-Hughes y col, 2010; Fernández y col, 2013).

DGGE de los productos de PCR anidada (muestras de leche materna y heces de sus respectivos lactantes) de los pares donantes 2, 4 y 5:

En la corrida de DGGE (figura 22), se puede apreciar una banda común que co-migra entre muestras pares (madre y lactante). Esta banda es común para los tres pares de muestras (par donante 2, 4 y 5), y coinciden con la banda perteneciente a la secuencia patrón (*Lactobacillus rhamnosus*). Este patrón de corrida demuestra que efectivamente existe ADN de bacterias del género de los *Lactobacillus*, tanto en la leche materna como en la microbiota del lactante (muestras de heces) que fue alimentado exclusivamente con leche materna.

Estos resultados sugieren que la leche materna influye en la microbiota de los lactantes. Sin embargo, para establecer una relación directa entre la leche materna y la microbiota de sus respectivos lactantes es necesaria obtener mediante secuenciación la identidad de las bandas resueltas por DGGE, y determinar los porcentajes de similitud que permitan establecer si realmente existe relación entre las bacterias detectadas en la leche materna y las detectadas en la microbiota del lactante. El hecho de haber detectado mediante PCR, la presencia de lactobacilos tanto en muestras de leche materna como en heces de los lactantes, además de haber obtenido un perfil de DGGE (figura 22) con bandas que co-migran entre dichos pares (madre y lactante) sugiere, como ha sido reportado en varios trabajos, que la leche procedente de la madre influye en la microbiota de niños que han sido alimentados exclusivamente con este fluido natural (Donnet-Hughes y col, 2010; Fernández y col, 2013; Rodríguez y col, 2008; Pérez y col, 2007). Adicionalmente varios autores señalan la presencia de bacterias pertenecientes al grupo de los *Lactobacillus* en la

leche materna (Donnet-Hughes y col, 2010; Heikkilä y Saris, 2003; Pérez y col, 2007; Martín y col, 2003) y destacan que la administración de *Lactobacillus* a través de la lactancia podrían reducir en un 46% las infecciones intestinales y en 27% las infecciones del tracto respiratorio (Fernández y col, 2013).

Adicionalmente se han observado diferencias entre las bandas encontradas en los carriles pertenecientes a las muestras de leche materna, en comparación al perfil de corrida de las muestras de heces de sus respectivos lactantes (figura 22). Estas diferencias son más visibles entre la muestra de leche de la donante 5 (carril 5) y la muestra de heces de su lactante (carril 6). Estas desigualdades pueden además apreciarse entre los diferentes pares donantes. Estas diferencias podrían ser por un lado, consecuencia de la colonización de bacterias durante el parto, especialmente por el fluido vaginal de la madre, así como por bacterias de la piel de esta y hasta del ambiente (Martin y Sela 20012).

Otro factor de vital importancia que podría explicar estas diferencias es la dieta, sin embargo en el caso de los pares donantes 2, 4 y 5, todos fueron alimentados exclusivamente con leche materna. Aun así, existen componentes en la leche materna como los HMO (oligosacáridos de la leche humana), los cuales difieren químicamente entre una madre y otra y pudieran seleccionar el crecimiento y establecimiento de diferentes bacterias en el intestino del recién nacido (Martin y Sela, 2012).

En la leche materna además de los HMO también encontramos a los HMG (glicoconjugados de leche humana), los cuales tienen propiedades prebióticas que en conjunto tienen la capacidad de modificar la microbiota intestinal y estimular el

crecimiento de bacterias mutualistas, confiriendo beneficios a la salud (Newburg y Grave, 2014). Los HMO y sus componentes glicosidados pueden promover el crecimiento de bacterias mutualistas, y la fermentación de estos prebióticos por parte de estos microorganismos acidifican la mucosa intestinal inhibiendo el establecimiento de bacterias patógenas y oportunistas (Yu, Chen y Kling, 2013).

Adicionalmente estos carbohidratos complejos contenidos en la leche materna tienen la capacidad de inhibir la adhesión de patógenos al intestino del recién nacido, debido a la analogía química entre estos y los glicanos expresados en células de la mucosa intestinal (Newburg y Grave, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que los glicanos expresados en la superficie de la mucosa intestinal del neonato permiten la adhesión de diferentes bacterias, por ejemplo: bacterias que utilizan fucosa y se adhieren específicamente a células intestinales con secreciones de glicanos fucosilados (Nanthakumar, Meng y Newburg, 2013), y variaciones genéticas asociadas con la glucosiltransferasa entre diferentes infantes resultan en diferencias en el tipo de glicosidación en la mucosa intestinal del neonato, por lo que estas diferencias podrían ser las responsables de las diferencias en la colonización del intestino (Morrow y col, 2013).

Es importante mencionar que la bioquímica del hospedador, la cual está determinada por el genotipo, podría ser el principal factor a determinar la composición microbiana, sin embargo la dieta estaría influenciando las actividades metabólicas de los grupos bacterianos presentes en el intestino, y de esta manera podría cambiar la preponderancia de ciertas especies bacterianas por sobre otras (Gaskins y col, 2008).

La producción de estas moléculas en la leche materna también difiere entre madres, debido aparentemente a las diferencias alélicas de genes implicados en la expresión de la glicosiltransferasa responsable de los diferentes tipos de glicanos en la leche humana (Coppa, Gabrielli y Zampini, 2011), por lo que la selección de los microorganismos que finalmente se establecerán en el intestino del recién nacido dependerá tanto por el fenotipo de los glicanos expresados por las células del epitelio intestinal, como por las características químicas de los oligosacáridos y glicanos contenidos en la leche materna, los cuales serán el reflejo del genotipo de las glicosiltransferasas tanto del infante como de la madre (Newburg y Morelli, 2014).

En el presente trabajo no fue posible secuenciar e identificar el contenido exacto de las bacterias del género de los *Lactobacillus* presentes en las muestras procesadas, debido a la imposibilidad de resolver y separar, mediante DGGE, los amplicones obtenidos, por lo que no se pudo concluir si efectivamente, los lactobacilos detectados en las heces del lactante, son influencia directa de los lactobacilos detectados en la leche de sus respectivas madres.

Sin embargo estos resultados no hacen más que reflejar la importancia biológica que tiene la leche materna en el establecimiento de una flora intestinal beneficiosa para el recién nacido. Entre los *Lactobacillus* aislados normalmente en este fluido, se encuentran especies como *L. gesseri*, *L. plantarum*, *L. salivarium*, *L. fermentum*, y *L. rhamnosus*, las cuales poseen un potencial probiótico similar o superior en comparación con otras cepas la

lactobacilos ampliamente comercializadas como es el caso de *L. rhamnosus* GG, *L. casei immunitas*, o *L. johnsonii* (Martín y col, 2004; Martín y col, 2006).

La presencia de bacterias comensales y/o mutualistas en la leche materna y la influencia de estas en el establecimiento de una microbiota benéfica en el neonato determina el correcto desarrollo del sistema inmune del neonato, dado que se ha observado que durante la infancia temprana, las bacterias en el intestino estimulan la expresión de los receptores TLR (toll like receptors), importantes para la detección de antígenos potencialmente perjudiciales por parte de células epiteliales del intestino y en células dendríticas en el tracto gastrointestinal permitiendo que bacterias que continuamente transitan por el lumen intestinal sean censadas por estas TLR, disparando la producción de factores inmunológicos como las inmunoglobulinas, involucrados en la protección del ambiente intestinal además de estimular la producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias, por lo que los continuos desafíos antigénicos a los que se enfrenta el sistema inmune en el intestino por la entrada de bacterias comensales y patógenas parecen desarrollar en el sistema inmune la capacidad de reaccionar adecuadamente ante lo perjudicial y no perjudicial, y desencadenar por un lado repuestas pro-inflamatorias e inmunológicas, y por otro lado a tolerar (o no reaccionar) ante microorganismos no patógenos, y de esta manera desarrollar un sistema inmune saludable y balanceado (Lawrence y Pane, 2007; Rakoff-Nahoum y Medzhitov, 2006).

7 Conclusiones:

- Se detectó ADN bacteriano para las muestras procesadas de leche materna humana con cebadores universales, lo que demuestra la presencia de una microbiota bacteriana en la leche de mujeres sanas.
- Se obtuvieron amplificadores para 10 de las 12 muestras de leche materna, con cebadores grupo específicos para *Lactobacillus*, lo que demuestra la presencia de ADN de bacterias de este grupo en el 83.3% de las madres donantes.
- El perfil de corrida del DGGE demostró la presencia de secuencias de ADN pertenecientes a bacterias del grupo de los *Lactobacillus*, que co-migraron tanto para las muestras de leche materna como en las muestras de heces de sus respectivos lactantes.
- Los resultados de DGGE sugieren que la leche materna podría estar influyendo, al menos parcialmente, en la composición de la microbiota del lactante.
- Para corroborar que efectivamente, el ADN encontrado en la leche materna guarda relación directa con el ADN en heces del lactante, se sugiere el escindido y posterior secuenciación de las bandas co-migrantes en el DGGE, a fin de establecer los porcentajes de similitud entre estos.

PERSPECTIVAS:

Los avances recientes en los métodos para analizar comunidades microbianas hacen posible vislumbrar que en el futuro se podrán complementar a los métodos microbiológicos clásicos para obtener información sobre aspectos importantes de la ecología microbiana de la leche humana: diversidad, estructura y función. Se hace necesario abordar las preguntas ¿cuál es la verdadera diversidad microbiana de este nicho? ¿Qué especies presentan actividad o mayor actividad? ¿Cómo cambian las poblaciones microbianas durante la lactancia o al variar factores ambientales? ¿Cómo interactúan los microorganismos que coexisten en leche, entre sí?

En relación a la detección de su actividad, es interesante pensar en el análisis de genes funcionales. Mientras la detección por DGGE da una idea de la actividad microbiana, para la detección de actividades específicas, sería necesario cuantificar los mRNAs particulares de enzimas, digamos por ejemplo mediante la tecnología de microarreglos.

El mejor conocimiento sobre la composición microbiana existente en la leche humana pudiera permitir monitorear y controlar el desarrollo y la actividad de las poblaciones microbianas complejas que se requiere actúen en el desarrollo óptimo de los lactantes.

8 Bibliografía

- : Kisand V. y Wikner J. 2003. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *J Microbiol Methods*. **54**(2):183-91.
- Ahrné S, Lönnemark E, Wold AE, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R. 2005 Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbiol Infect.*; **7**: 1.256-1.262.
- American Academy of Pediatrics. 1997. Breastfeeding and the use of human milk. Work Group on Breastfeeding. *Pediatrics*; **100**:1035–1039.
- Anne Donnet-Hughes, Pablo F. Perez, Joël Doré, Marion Leclerc, Florence Levenez, Jalil Benyacoub, Patrick Serrant, Iris Segura-Roggero y Eduardo J. Schiffrin 2010. 3rd International Immunonutrition Workshop. Session 7: Prebiotics and probiotics usefulness against pathologies Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proceedings of the Nutrition Society*. **69**, 407–415.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, y Gordon JI. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**:1915–1920.
- Bertotto A, Gerli R, Castellucci G, Scalise F, Vaccaro R. 1991. Human milk lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor are mostly delta TCS1-positive cells. *Immunology*. **74**:360–361.

- Butler, J.M. and Hill, C.R. Scientific Issues with Analysis of Low Amounts of DNA. 2010. <http://worldwide.promega.com/resources/profiles-in-dna/2010/scientific-issues-with-analysis-of-low-amounts-of-dna/>. [consultado: 6 de marzo de 2015].
- Chen, K., H. Neimark, P. Rumore, y C. R. Steinman. 1989. Broad-range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. FEMS.
- Coppa GV, Gabrielli O, Zampini L. 2011. Oligosaccharides in 4 different milk groups, Bifidobacteria, and Ruminococcus obeum. J Pediatr Gastroenterol Nutr. **53**:80–7.
- Cukrowska B, Lodínova-Zádníková R, Enders C, Sonnenborn U, Schulze J, Tlaskalova-Hogenova H. 2002. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with non-pathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. Scand J immunol. **55**: 204-209.
- Dai D, Walker WA. 1999. Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. *Adv Pediatr*. **46**:353-382.
- Donnet-Hughes A, Perez P, Dore J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I y Schiffrin E. 2010. Prebiotics and probiotics usefulness against pathologies Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proceedings of the Nutrition Society*. **69**, 407–415
- Dubnau, D., I. Smith, P. Morell, y Marmur, J. 1965. Gene conservation in Bacillus species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **54**:491-498.

- Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans ADL. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 219-226.
- Fernández L, Langaa S, Martínez V, Maldonadoa A, Jiménez E, Martínez R, y Rodríguez J. 2013. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research.***69** 1– 10
- Gao Z, Tseng C, Pei Z, Blaser MJ. 2007. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc Natl Acad Sci U S A.***104**:2927–2932.
- Gaskins HR1, Croix JA, Nakamura N, y Nava GM.2008. Impact of the intestinal microbiota on the development of mucosal defense.*Clin Infect Dis.***1**:46.
- Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, NISC Bouffard GG, Blakesley RW, Murray PR, Green ED, Turner ML, Segre JA. 2009. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science.***324**:1190–1192.
- Grozdanov L, Raasch C, Schulz J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J. 2002. Analysis of the genome structure of the non pathogenic probiotics *Escherichia coli* strain Nissle 1917. **186 (5)**. 5432-4441.
- Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. 2007. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation. *Neonatology.* **92**:64–66.
- Heikkilä MP, Saris PEJ. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol.* **95**: 471-478.

- Heilig, H., Zoetendal, E., Vaughan, E., Marteau, P., Akkermans, A., y de Vos, W. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus spp.* and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol.* **68 (1)**. p.114-123.
- Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UME, Beck DL, Abdo Z. 2011. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS ONE.***6**:e21313.
- Jackson K. M. Nazar AM. 2006. Breastfeeding, The immune response, and long –term health. *J Am Osteopath Assoc.* **106**: 203-207.
- Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, Arroyo R, Albújar M, García N. 2008a. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiology.* **8**:143.
- Jiménez E, Fernández L. Delgado S, García N, Albújar M, Gómez A, Rodríguez JM. 2008b. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum by cultural-based techniques. Analysis of the staphylococcal and enterococcal populations. *Research in Microbiology.***159**:595–601.
- Kirjavainen PV, Apostolou E, Arvola T, Salminen SJ, Gibson GR, Isolauri E. 2001. Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **32**: 1-7.
- Klug W, Cummings M y Spencer C. 2006. Conceptos de genética. Octava Edición. Pearson Educación. Madrid España.

- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. *In* E. Stackebrandt y M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley y Sons, Chichester, United Kingdom.
- Langa S, Maldonado A, Delgado S, Martín R, Martín V, Jiménez E. 2012. Characterization of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a strain isolated from human milk: from genotype to phenotype. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **94**:1279–87.
- Langa S. 2006. Interactions between lactic acid bacteria, intestinal epithelial cells and immune cells. Development of in vitro models. Tesis PhD. Madrid: Complutense University of Madrid.
- Lawrence RM y Pane CA. 2007. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* **37**:7–36
- Lonnerdal B. 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr*. **77**, 1537S–1543S.
- Macpherson AJ, Uhr T. 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*. **303**:1662–1665.
- Magne F, Hachelaf W, Suau A, Boudraa G, Mangin I, Touhami M, Bouziane-Nedjadi K, y Pochart P. 2006. A longitudinal study of infant faecal microbiota during weaning. *FEMS Microbiol Ecol* **58**:563–571.
- Makino H, Kushiro A, Ishikawa E, Muylaert D, Kubota H, Sakai T. 2011 Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant,

determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Applied and Environment Microbiology*.**77**:6788–6793.

- Marteau P, Pochart P, Dore J, Bera-Maillet C, Bernalier A, y Corthier G. 2001. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* **67**:4939.
- Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, Jiménez E, Fernández L, Smidt H. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women. 2007. **158**: 31-37.
- Martín R, Jiménez E, Heilig HG, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, y col. 2009. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environment Microbiology*.**75**: 965–969.
- Martín R, Jiménez E, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J. 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int J Food Microbiol*. **112**: 35-43.
- Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, y col. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics*.**143**:754–758.
- Martin, M. A. y Sela, D. A. 2013. Infant Gut Microbiota: Developmental Influences and Health Outcomes. Building Babies, Developments in Primatology: Progress and Prospects.**37**: 233-256

- Matricardi PM. 2010. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: controversial aspects of the 'hygiene hypothesis'. *Clin Exp Immunol.* **160**:98-105
- Morelli, L. 2008. Postnatal Development of Intestinal Microflora as Influenced by Infant Nutrition. *J. Nutr.* **138**:1791S-1795S.
- Morrow AL, Lagomarcino AJ, Schibler KR, Taft DH, Yu Z, Wang B, Altaye M, Wagner M, Gevers D, Ward DV, Kennedy MA, Huttenhower C, y Newburg DS.2013. Early microbial and metabolomic signatures predict later onset of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Microbiome.* **1**:13.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A. G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**. 695-700.
- Nanthakumar NN, Meng D y Newburg DS. 2013. Glucocorticoids and microbiota regulate ontogeny of intestinal fucosyltransferase 2 requisite for gut homeostasis. *Glycobiology.* **23**:1131–41.
- Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. 2009. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Research.* **19**:636–643.
- Neu J, Lorca G, Kingma SDK, y Triplett EW. 2010. The intestinal microbiome: relationship to type1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* **39**:563–571.
- Newburg D. S. y Grave G. 2014. Recent advances in human milk glycobiology. *Pediatr Res.* 2014 May; 75(5): 675–679.

- Nikolchela L, Cockshutt A, y Bärlocher F. 2003. Determining diversity of freshwater fungus on decomposing leaves: comparison of traditional and molecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 2546- 2554.
- Nübel U, Garcia-Pichel F, Kühl M, y Muyzer G. 1999. Quantifying microbial diversity: morphotypes 16s rRNA genes and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Applied and environmental microbiology*. **65**: 422-430.
- Penders J, Thijs C, Van Den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, Adams H, Van Ree R, y Stobberingh EE. 2007. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA birth cohort study. *Gut* **56**:661–667.
- Perez P, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrin E, y Donnet-Hughes A. 2007. Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells? *Pediatrics*.**119**;e724
- Poulsen K., y Stahl D. 1993. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:682–686.
- Rakoff-Nahoum S. y Medzhitov R. 2006. Role of the innate immune system and host-commensalmutualism. *Curr Top Microbiol Immunol*.**308**:1–18
- Relman, D. A.1999. The search for unrecognized pathogens. *Science*. **284**: 1308–1310.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolín M, Rotta G, Bonasio R. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*.**2**:361–367.

- Rinne MM, Gueimonde M, Kalliomäki M, Hoppu U, Salminen SJ, Isolauri E. 2005. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **43**: 59-65.
- Rodríguez J M, Jiménez E, Merino V, Maldonado A, Marín ML, Fernández L, Martín R. 2008. Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. *Acta Pediatr. Esp.* **66(2)**: 77-82.
- Roitt I. 2001. Essential immunology. *Oxford: Blackwell Scientific Publications.*
- Rook GAW, Lowry CA, Raison CL. 2013. "Microbial 'Old Friends', immunoregulation and stress resilience". *Evolution, Medicine, and Public Health.* 46. doi:10.1093/emph/eot004
- Round JL, y Mazmanian SK. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**:313–323.
- Rychlik W., Spencer, W.J. y Rhoads, R.E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research.* **18(21)** 6409.
- Sanders ME. 1994. Lactic acid bacteria as promoters of human health. In: Goldberg I (ed). *Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals.* Aspen Publications, Frederick. 294–322.
- Sanz Y. 2011. Gut microbiota and probiotics in maternal and infant health. *American Journal of Clinical Nutrition.* **94(6)**:2000S–2005S.
- Shorter RG, Huizenga KA, y Spencer RJ. 1972. A working hypothesis for the etiology and pathogenesis of nonspecific inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* **17**:1024–1032.

- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, y Gordon JI. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**:1027–1131.
- Vahtovuo J, Toivanen P, Eerola E. 2003. Bacterial composition of murine fecal microflora is indigenous and genetically guided. *FEMS Microbiol Ecol.* **44**:131–6.
- Von Hertzen L, Hanski I, Haahtela T 2011 Natural immunity. Biodiversity loss and inflammatory diseases are two global megatrends that might be related. *EMBO Rep.* **12**(11) 1089-1093.
- West PA, Hewitt JH y Murphy OM. 1979. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J Appl Bacteriol.* **46**, 269–277.
- Woese, C. R., Guttel R. Gupta, y H. R. Noller. 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16s-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* **47**:621-669.
- Woese, CR. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221-271.
- Yang F, Zeng X, Ning K, Liu KL, Lo CC, Wang W, y col. 2012. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME Journal.* **6**:1–10.
- Yu Z -T, Chen C, y Kling DE. 2013 The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. **23**:169-77.
- Zhang L, y Li N, Neu J. 2005. Probiotics for preterm infants. *NeoReviews* **6**:e227.
- Zhang MM, Cheng JQ, Xia L, Lu YR, y Wu XT. 2011. Monitoring intestinal microbiota profile: a promising method for the ultraearly detection of colorectal cancer. *Med Hypotheses* **76**:670–672.

- Zivkovic AM, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. 2011. Human milk glyco-biome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA*. **108**:4653–4658.
- Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, de Visser JAGM, y de Vos WM. 2001. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis*. **13**:129–34.
- Zoetendal EG, Cheng B, Koike S, y Mackie RI. 2004a. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Curr Issues Intest Microbiol*. **5**:31-47.
- Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, y Gaskins HR. 2004b. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr*. **134**:465–72.
- Zoetendal, E., Collier, C., Koike, S., Mackie, R., y Gaskins, H. R. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr*. **134(2)**:465-472.
- Zoetendal, E.G. y Akkermans, A. D., de vos, W. M., 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*. **64**. 3854-3859.