



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Asociación de Linfocitos T reguladores (Treg), Concentración de IgA y el género bacteriano *Bifidobacterium* en calostro humano

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA

CARLOS DOMÍNGUEZ VANEGAS



CIUDAD DE MÉXICO

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Rodolfo Pastelín Palacios
VOCAL: Profesor: Constantino III Roberto López Macías
SECRETARIO: Profesor: Ismael Mancilla Herrera
1er. SUPLENTE: Profesor: Rosa Camacho Sandoval
2° SUPLENTE: Profesor: Octavio Castro Escamilla

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE LA TORRE DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA “ISIDRO ESPINOZA DE LOS REYES”

ASESOR DEL TEMA: DR EN C. ISMAEL MANCILLA HERRERA

(Nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. EN C. ALMA HERRERA SALAZAR

(Nombre y firma)

SUSTENTANTE: CARLOS DOMÍNGUEZ VANEGAS

(Nombre y firma)

RESUMEN

Además de ser la mejor fuente de nutrientes para los neonatos e infantes, la leche materna también provee diversos elementos bioactivos que promueven el desarrollo del sistema inmunológico protegiéndolo contra diversas enfermedades como sepsis, neumonía, otitis media, diarrea y enterocolitis necrosante y no infecciosas como asma. Estos elementos incluyen a leucocitos, anticuerpos y bacterias comensales. Los leucocitos transportados a través de la leche materna son capaces de transferir memoria inmunológica y protección. Recientemente se describió la presencia de linfocitos T reguladores (Treg) en calostro que potencialmente son capaces de tolerar los primeros retos antigénicos y se ha propuesto que favorecerían la colonización bacteriana del lactante, así como la producción de anticuerpos de isotipo IgA. Este tipo de anticuerpos se especializan en la neutralización de microorganismos en el tracto gastrointestinal y vías respiratorias, por lo que moldean la biodiversidad de la microbiota del lactante. Además de las células maternas, las bacterias contenidas en la leche son transferidas verticalmente, siendo este medio la principal fuente de microorganismos que colonizarán el sistema gastrointestinal del neonato. Dentro de las bacterias transferidas, el género *Bifidobacterium* resalta por sus propiedades metabólicas, protectoras, e inmunoregulatoras, ya que se han asociado a la inducción de Treg intestinales e inducir anticuerpos del isotipo IgA. Sin embargo, se desconoce si existe alguna asociación entre los linfocitos Treg, IgAs y Bifidobacterias. Para contestar esta pregunta, de muestras de calostro de mujeres puérperas sanas se extrajo el DNA total y por PCR tiempo real se cuantificó la cantidad de DNA de *Bifidobacterium*. De las mismas muestras se obtuvo el paquete celular y se cuantificaron linfocitos Treg, así como la expresión de las moléculas CD279, CD152, TGF- β e IL-10 a través de citometría de flujo, y del suero se cuantificó la concentración de IgAs por inmunoensayos. Encontramos que la presencia de Treg está inversamente relacionada con la concentración de IgAs ($r_{\text{Spearman}} = -0.94$, $P < 0.001$), pero directamente con el predominio de Bifidobacterias ($r_{\text{Spearman}} = 0.62$, $P = 0.02$), sin tener relación con la expresión de moléculas asociadas a la inmunoregulación. Este estudio muestra por primera vez que los componentes del calostro humano están relacionados entre sí y estudiarlos a profundidad ayudaría a entender como el balance del eje Linfocitos-IgA-Bacterias ayudan al mantenimiento de la homeostasis del neonato y su relación con estados patológicos.

ABREVIATURAS

- CD:** *Cluster de Diferenciación*
- CPA:** *Células Presentadoras de Antígeno*
- Cu:** *Ciclo umbral*
- CTLA-4:** *Antígeno 4 Asociado a linfocito T citotóxico*
- DNA:** *Ácido Desoxirribonucleico*
- EPS:** *Exopolisacárido*
- FoxP3:** *Forhead box P3*
- FVD:** *Fixable Viability Dye*
- GALT:** *Tejido Linfoide Asociado a Intestino*
- HMO:** *Oligosacáridos de la Leche Humana*
- IEC:** *Células Epiteliales Intestinales*
- IFN:** *Interferón*
- Ig:** *Inmunoglobulina*
- IL:** *Interleucina*
- IMC:** *Índice de Masa Corporal*
- IMF:** *Intensidad Media de Fluorescencia*
- LME:** *Lactancia Materna Exclusiva*
- MALT:** *Tejido Linfoide Asociado a Mucosas*
- MHC:** *Complejo Principal de Histocompatibilida*
- NEC:** *Enterocolitis Necrosante*
- NK:** *Natural Killer*
- PCR:** *Reacción en Cadena de la Polimerasa*
- PD-1:** *Molécula coestimuladora de muerte Programada-1*
- PP:** *Placas de Peyer*
- qPCR:** *Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa*
- rRNA:** *Ácido ribonucleico ribosomal*
- SCFA:** *Ácidos Grasos de Cadena Corta*
- SDG:** *Semanas de Gestación*
- S-IgA:** *Inmunoglobulina A secretora*

TFH: *Linfocitos T cooperadores Foliculares*

TGF: *Factor de Crecimiento Transformante*

Th: *Linfocitos T Cooperadores*

TLR: *Receptor tipo Toll*

TNF: *Factor de Necrosis Tumoral*

Treg: *Linfocitos T reguladores*

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| Lactancia Materna..... | 3 |
| Síntesis y composición de la Leche Materna..... | 5 |
| Calostro..... | 6 |
| Componentes Nutricionales de la Leche Materna..... | 8 |
| Proteínas..... | 8 |
| Lípidos..... | 9 |
| Carbohidratos..... | 11 |
| Nucleótidos..... | 13 |
| Factores que afectan la composición del Calostro..... | 14 |
| Componentes Inmunológicos de la Leche Materna..... | 15 |
| Componentes solubles..... | 16 |
| Componentes Celulares..... | 19 |
| Linfocitos T en la Leche Materna..... | 20 |
| Microbiota en Leche Materna..... | 24 |
| <i>Bifidobacterium</i> en el intestino..... | 31 |
| Relación Linfocitos Treg, Bacterias e IgA en el intestino..... | 35 |
| JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO | 39 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 40 |
| HIPÓTESIS | 40 |
| OBJETIVO GENERAL | 40 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 41 |
| Diseño de estudio..... | 41 |
| Población de Estudio..... | 41 |
| Recolección de la muestra..... | 41 |
| Determinación de DNA Bacteriano..... | 42 |
| Obtención de suero y de células de calostro..... | 45 |
| Identificación de Linfocitos Treg..... | 45 |
| Cuantificación de la concentración de IgAs en calostro..... | 49 |
| Análisis Estadístico..... | 49 |
| RESULTADOS | 50 |
| DISCUSIÓN | 60 |
| CONCLUSIÓN | 67 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |
| MATERIAL SUPLEMENTARIO | 92 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1. Composición de Macromoléculas en la Leche Materna | 12 |
| Figura 2. Mecanismos de inmunoregulación de los Linfocitos Treg | 23 |
| Figura 3. Las bacterias comensales provocan respuesta de Linfocitos T | 25 |
| Figura 4. Vía Entero-Linfática-Mamaria | 28 |
| Figura 5. Adaptaciones fisiológicas del cuerpo durante embarazo que pueden favorecer la translocación bacteriana | 30 |
| Figura 6. Representación esquemática de la respuesta inmune ocasionada por <i>Bifidobacterium</i> spp | 34 |
| Figura 7. Algoritmo de análisis para la identificación y caracterización de Linfocitos T reguladores en Calostro | 48 |
| Figura 8. Expresión de moléculas inmunoreguladoras en Calostro | 48 |
| Figura 9. Amplificados obtenidos a partir de los primers para bacterias (primers Universales) y el género <i>Bifidobacterium</i> | 52 |
| Figura 10. Curvas de cuantificación de cantidad de DNA mediante PCR en tiempo real | 54 |
| Figura 11. El porcentaje de DNA del género <i>Bifidobacterium</i> en Calostro es mayor en los nacimientos pretérmino | 54 |
| Figura 12. El DNA bacteriano total y el DNA de <i>Bifidobacterium</i> no es afectado por la vía de nacimiento | 56 |
| Figura 13. La presencia de Treg está inversamente relacionada con la concentración de IgAs, pero directamente con el predominio de Bifidobacterias | 59 |
| Figura 14. Relación Treg-IgA´s-Bacterias en Calostro humano | 66 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1. Beneficios de la Lactancia | 5 |
| Tabla 2. Componentes inmunológicos del Calostro | 7 |
| Tabla 3. Secuencias y características de los iniciadores utilizados | 43 |
| Tabla 4. Anticuerpos monoclonales utilizados para el inmunomarcaje de superficie | 46 |
| Tabla 5. Anticuerpos monoclonales utilizados para el inmunomarcaje intracelular | 47 |
| Tabla 6. Datos demográficos del universo de estudio | 50 |
| Tabla 7. Agrupación de la población de estudio con relación a la edad gestacional | 51 |
| Tabla 8. Agrupación de la población de estudio con relación a la vía de nacimiento | 51 |
| Tabla 9. Secuencias representativas de los alineamientos de los amplificados obtenidos con los iniciadores Universales y del género <i>Bifidobacterium</i> | 52 |
| Tabla 10. Comparación de las características de Treg e IgAs en Calostro de acuerdo al tiempo de gestación | 55 |
| Tabla 11. Comparación de las características de Treg e IgAs en Calostro de acuerdo a la vía de nacimiento | 56 |
| Tabla 12. Relación IgAs-Treg-Bifidobacterias | 58 |
| Tabla S1. Secuencias con altos porcentajes de identidad de los amplificados de los iniciadores de bacterias totales | 94 |

INTRODUCCIÓN

Lactancia Materna

La leche materna es un fluido biológico complejo, producido por la madre después del parto para proveer nutrientes y protección al neonato e infante en sus primeros meses de vida. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda brindar a los neonatos amamantación exclusiva durante los primeros 6 meses de vida, refiriéndose a ésta como una alimentación libre de otros líquidos, sólidos o vitaminas^{1, 2}.

Los beneficios nutricionales e inmunológico de la lactancia materna exclusiva (LME) en la salud, desarrollo y protección del infante han permitido nombrar a la lactancia materna como el “estándar de oro” para la alimentación temprana de los infantes a nivel mundial. De esta manera, la práctica de la LME disminuye la incidencia y mejora los pronósticos de una gran cantidad de enfermedades infecciosas y no infecciosas a corto y largo plazo en la descendencia³.

Durante los primeros 1000 días de vida, dentro de los cuales los 28 días son en los que el neonato tiene el mayor riesgo de muerte, el cerebro y el cuerpo del infante se desarrolla con mayor rapidez en comparación con otras etapas de la vida. Es un periodo limitado del desarrollo temprano caracterizado por una gran plasticidad cuando la nutrición y otros factores ambientales tienen efectos a largo plazo en la fisiología, función, salud y enfermedad del humano⁴.

Si el infante no recibe una alimentación correcta en esta etapa, el daño causado puede ser irreversible. Las consecuencias inmediatas de la desnutrición durante los primeros 1000 días incluyen un mayor riesgo de enfermar y morir, así como un desarrollo mental y motor retrasado. Las consecuencias a largo plazo están relacionadas con un menor rendimiento intelectual, una menor capacidad de trabajo y riesgos en la salud general en etapas posteriores para el infante^{5, 6}.

La LME trae consigo beneficios tanto para la madre como para el infante; en la madre la lactancia la protege contra enfermedades de corto y largo plazo como hipertensión, obesidad, diabetes, depresión y cáncer de mama y ovario. Por otro

lado, al infante la lactancia materna potencializa el desarrollo cognoscitivo, reduce el riesgo de morbimortalidades en edades temprana y refuerza el sistema inmunitario, a la vez que previene el desarrollo de sobrepeso u obesidad y otras enfermedades crónicas en etapas posteriores de la vida⁴.

Durante su primer año de vida los infantes que reciben LME, son protegidos contra las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil incluyendo muerte súbita, enterocolitis necrosante, diarreas, otitis media e infecciones respiratorias de vías altas y bajas^{2, 7, 8}. Esto la hace la práctica más corto-efectivas para prevenir la mortalidad infantil. De acuerdo a la OMS los niños de países de medianos y bajos ingresos que no son amamantados tienen seis veces más riesgo de morir por enfermedades infecciosas durante los primeros 2 meses de vida que aquellos que son amamantados⁸.

El efecto protector de la lactancia se extiende a etapas posteriores y hay evidencia que enfermedades crónicas como dermatitis, asma, exceso de peso, diabetes tipo 1 y 2 y leucemia⁹ son prevenidas. Algunos de los beneficios de la lactancia a corto y largo plazo son mostrados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Beneficios de la Lactancia

| Condición | %Disminución de Riesgo | Tipo de Lactancia |
|---|------------------------|----------------------------|
| Otitis media | 23 | Cualquiera |
| Otitis media | 50 | ≥3 o 6 meses |
| Otitis media recurrente | 77 | Exclusivamente BF ≥6 meses |
| Infección respiratoria de la vía superior | 63 | >6 meses |
| Infección respiratoria de la vía inferior | 72 | ≥4 meses |
| Infección respiratoria de la vía inferior | 77 | Exclusivamente LM ≥6 meses |
| Asma | 40 | ≥3 meses |
| Asma | 26 | ≥3 meses |
| Bronquitis VSR | 74 | >4 meses |
| Enterocolitis necrosante | 77 | Estancia UCI |
| Dermatitis atópica | 27 | >3 meses |
| Dermatitis atópica | 42 | >3 meses |
| Gastroenteritis | 64 | Cualquiera |
| Enfermedad intestinal inflamatoria | 31 | Cualquiera |
| Obesidad | 24 | Cualquiera |
| Enfermedad celíaca | 52 | >2 meses |
| Diabetes tipo 1 | 30 | >3 meses |
| Diabetes tipo 2 | 40 | Cualquiera |
| Todo tipo de Leucemia | 20 | >6 meses |
| Leucemia mielógena aguda | 15 | >6 meses |
| Muerte súbita | 36 | Cualquiera >1 meses |

LME: Lactancia materna exclusiva, LM: Lactancia materna, UCI: Unidad de Cuidados intensivos. VSR: Virus Sincitial Respiratorio. Modificado de Breastfeeding and the Use of Human Milk. 2016.e827-e837

Síntesis y composición de la leche materna

La capacidad para sintetizar y segregar el producto lácteo se denomina **Lactogénesis** y se compone de dos etapas: Lactogénesis I y Lactogénesis II. La Lactogénesis I comienza alrededor de las 24 semanas de gestación, y se debe a cambios morfológicos en el epitelio alveolar y neo-vascularización que contribuyen al aumento del volumen mamario. En esta etapa comienza la síntesis de los compuestos lácteos (como la lactosa), proteínas (α -Lactoalbumina, lactoferrina, slgA, lisozima, lipasas y amilasas) y grasas (triglicéridos y ácidos grasos poliinsaturados)^{10, 11}. Por otra parte, la Lactogénesis II (o activación secretora) ocurre entre 48 y 72 horas después del parto por una disminución de progesterona y estrógenos y aumento en los niveles de prolactina¹².

El efecto de la prolactina en las glándulas mamarias es estimular la producción de leche y la proliferación celular por lo que en la Lactogénesis II empieza la secreción de la leche materna^{11,13}. En esta etapa, los niveles de prolactina en la sangre son altos durante la lactación temprana y disminuye gradualmente con el progreso de la lactación¹⁴.

La leche es un fluido complejo, su composición va cambiando gradualmente acorde al estado de lactación, alimentación del infante, estado de salud (de la madre y del recién nacido), dieta materna, factores ambientales y genéticos¹⁵. Dependiendo de los componentes que la constituyen a lo largo de la lactancia se dividen en: calostro, leche de transición y leche madura. El producto inicial es el calostro (presente en los primeros 3 a 4 días), el cual combina elementos nutricionales e inmunológicos. Posteriormente, la leche de transición (producida hasta los 2 a 3 meses después del parto) con menos inmunoglobulinas y proteínas totales y finalmente la leche madura, que está compuesta por grasas y proteínas suspendidas en una solución de lactosa^{11, 166}.

Calostro

De las tres fases de la leche materna, el calostro es característico por su alto contenido inmunológico más que por su contenido nutricional. Es un fluido espeso amarillento y contiene más de 250 proteínas con potencial inmunológico (lactoferrina, lisozima, etc.), hormonas, inmunoglobulinas (predominantemente IgA), citocinas, receptores solubles, y células inmunes (incluyendo macrófagos, neutrófilos y linfocitos)^{17, 18}. Muchos de sus componentes son resistentes a la degradación por las enzimas del sistema digestivo del neonato lo que permite una mayor vida media, debido a ello ejercer acciones protectoras, nutricias, de desarrollo, inmunoestimulantes e inmunomoduladoras¹⁹. Algunos de los componentes que se pueden encontrar en el calostro se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Componentes inmunológicos del Calostro

| Componentes solubles | Componentes celulares | Microbiota |
|---|--|---|
| Anticuerpos IgA/sIgA, sIgM, sIgG | 10 ⁴ - 10 ⁶ células/mL en calostro | 1x10 ⁵ – 1x10 ⁷ bacteria/800 mL/día |
| Defensinas | 10 ³ células/mL en leche madura | <i>Bifidobacterium</i> |
| Lisozima | Neutrófilos | <i>Lactobacillus</i> |
| Lactoferrina | Macrófagos | <i>Staphylococcus</i> |
| Lactoperoxidasa | Linfocitos CD4+ | <i>Streptococcus</i> |
| κ-caseína | Linfocitos CD8+ | <i>Enterococcus</i> |
| α-Lactoglobulina | Linfocitos Tγδ | <i>Veillonella</i> |
| Haptocorrina | Linfocitos B | <i>Gamella</i> |
| Osteoprotegerina | Linfocitos NK | <i>Clostridia</i> |
| sCD14 | Linfocitos Treg CD25+CD127- | <i>Propionibacterium</i> |
| Quimiocinas (como CXCR-1/CXCR-2, CXCL-9, IP-10, MCP-1) | Células Epiteliales | <i>Actinomyces</i> |
| Citocinas (como IL-1b, IL-2, IL-6, IL-8,IL-10, TGF-β, TGF- α ,TNF-α, IFN-γ) | | <i>Corynebacterium</i> |
| Hormonas (como Leptina, Adiponectina, Calcitonina) | | <i>Pseudomonas</i> |
| Factores de Crecimiento (como EGF, HB-EGF, FGF, M-CSF, Eritropoyetina, GM-CSF, HGF, IGF-1, IGF-2) | | <i>Shigomonas</i> |
| HMOs | | <i>Serratia</i> |
| Gangliósidos | | <i>Escherichia</i> |
| Lipidos (LCPUFAs) | | <i>Enterobacter</i> |
| Nucleótidos | | <i>Ralstonia</i> |
| miRNAs | | <i>Bradyrhizobium</i> |
| Antígenos alimenticios | | <i>Prevotella</i> |
| Antioxidantes | | |

Ig: Inmunoglobulina; **EGF:** Factor de crecimiento epidermal; **G-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos; **GM-CSF:** Factor estimulante de colonia de macrófagos y granulocitos; **FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos **IGF:** Factor de crecimiento insulínico; **HGF:** Factor de crecimiento de Hepatocitos; **HB-EGF:** Factor de crecimiento epidermal de unión a heparina; **IP-1:** Proteína de inducción de interferón gamma (IFN-γ); **HMOs:** Oligosacáridos de la leche humana; **LC-PUFAs:** ácidos poliinsaturados de cadena larga; **TGF:** Factor de crecimiento transformante; **TNF:** Factor de necrosis tumoral alfa. Modificado de Immunology of breast milk. 2016.584-591

Otros componentes de los leucocitos presentes en el calostro, son los receptores tipo Toll (TLRs) que son uno de los principales receptores de reconocimiento de patrón (PRR's) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), ejemplos de estos son dsRNA, ssRNA, flagelina, DNA CpG y LPS intra y extracelular²⁰. Además de favorecer la quimiotaxis, coestimulación, producción

de citocinas proinflamatorias e inmunoreguladoras, entre otras²¹. La respuesta y expresión de los TLRs en las células del calostro está modulada por componentes de la misma, afectando el reconocimiento y respuesta por parte de los TLRs a su ligandos²². LeBouder y colaboradores²³ encontraron que la respuesta de TLR2 disminuye y la respuesta de TLR4 aumenta en presencia de la leche materna, lo que permite el reconocimiento de bacterias Gram negativas potencialmente dañinas. Si bien, el calostro permite mejorar la respuesta frente al reconocimiento de ciertos microorganismos patógenos, también favorece el establecimiento de bacterias como del género *Bifidobacterium* (Gram positiva) a través de la baja reactividad de PRRs, como es el caso de TLR2. Lo cual es particularmente importante durante la colonización del intestino neonatal ya que el reconocimiento controlado de los microorganismos mantendrá la homeostasis intestinal.

Componentes Nutricionales de la Leche Materna

La composición nutricional de la leche materna, varía en cada mujer y a lo largo del tiempo de la lactancia, pero conservada a través de la población a pesar de las diferencias en los estados nutricionales maternos²⁴. Otros factores que modifican la composición de la leche son: índice de masa corporal (IMC), consumo de proteínas, retorno de la menstruación, frecuencia de amamantamiento y el volumen de leche producida²⁵. De manera general, los componentes nutricionales se relacionan con los principales grupos de biomoléculas, que incluyen proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Se ha encontrado que las madres que producen altas cantidades de leche tienen bajas concentraciones de grasa y proteína, con alta concentración de lactosa²⁵.

Proteínas: En la leche materna existen más de 400 proteínas diferentes que cumplen un papel crucial en el desarrollo del neonato. El contenido de proteínas en la leche materna disminuye rápidamente durante el primer mes de lactancia y después disminuye lentamente²⁶. La mayoría son sintetizadas por la glándula mamaria excepto la albúmina sérica (proveniente de la circulación materna). Estas proteínas se pueden dividir en tres grupos: caseínas, proteínas séricas y mucinas²⁶.

Los tres tipos de caseínas presentes son: α -, β -, κ - caseína, esta última estabiliza las caseínas insolubles α y β formando una suspensión coloidal. El contenido total de caseína con respecto a las demás proteínas es de aproximadamente 13%, la baja concentración de caseína se asocia a un lento crecimiento del infante²⁷. Las proteínas más abundantes en el suero de la leche son IgA secretora (SIgA), α -lactoalbumina, lactoferrina, lisozima y albumina sérica²⁶. Las mucinas están presentes en la membrana globular de las grasas de la leche, protegen al epitelio de infecciones, regulan vías de señalización y transcripción^{26, 28}.

Las funciones de estas proteínas son distintas, mientras que algunas son completamente digeridas en el ambiente ácido del intestino del neonato para proveer aminoácidos esenciales para el crecimiento y desarrollo del neonato²⁶, otras son parcialmente digeridas y cumplen funciones como facilitar la digestión y absorción de otros nutrientes en la leche, además de favorecer el desarrollo cognitivo, metabólico, del tracto gastrointestinal, así como actividad antimicrobiana e inmunológica^{29,30,31}. Factores como la edad gestacional afectan el contenido proteico ya que se ha reportado que el contenido proteína de madres que tuvieron un parto pretérmino es significativamente mayor que el de las madres con parto a término³². Los niveles de proteína disminuyen durante las primeras 4 o 6 semanas. Cabe resaltar que la concentración de proteína en la leche materna no es afectada por la dieta, pero incrementa con respecto al IMC y disminuye en madres que producen grandes cantidades de leche²⁵.

Compuestos nitrogenados no proteicos como la urea, ácido úrico, creatinina, creatina, aminoácidos y nucleótidos componen aproximadamente el 25% del total de componentes en la leche materna y tienen funciones como el de modular actividades enzimáticas, o actuar como mediadores metabólicos³³.

Lípidos: Los lípidos son la mayor fuente de energía en la leche materna y representan del 40 al 55% de contenido energético de la leche y durante los primeros 6 meses de vida representan hasta el 90% de energía³⁴. La amplia variedad de lípidos secretados son triglicéridos (98% del total de lípidos) el resto corresponde a diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos libres,

fosfolípidos y colesterol ³³. Además del contenido energético, los lípidos son importantes ya que proveen ácidos grasos esenciales (**EFAs** por sus siglas en inglés) y vitaminas solubles en lípidos como lo son la vitamina A, D, E y K ³⁵.

Además, contiene ácidos grasos poliinsaturados (**PUFAs** por sus siglas en inglés) y los **PUFAs** de cadena larga (**LC-PUFAs** por sus siglas en inglés) de las series metabólicas n-6 y n-3 (como el ácido oleico, linoleico y α -linoleico), los cuales, en modelos animales, influyen importantemente en el desarrollo de tolerancia inmunológica a antígenos alimenticios en las crías por la inducción de citocinas como el Factor de Crecimiento Transformante (**TGF**)- β ³⁶. Varios de estos lípidos (principalmente los monoglicéridos) y los ácidos grasos derivados de ellos son conocidos por modular la función gastrointestinal, metabolismo de las lipoproteínas, por ser componentes funcionales y estructurales de las membranas, ayudar al neurodesarrollo, participar en vías de señalización y protección contra virus envueltos (como el virus de la influenza), parásitos (como *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*) y bacterias como *Staphylococcus aureus* meticilina resistente^{35, 37}.

La composición de los lípidos depende positivamente de factores como la adiposidad materna, duración de la lactación, estado de lactación y edad materna y negativamente por la nutrición materna, infecciones, desórdenes metabólicos y el uso de medicamentos ³⁷. Además, factores genéticos, hábitos dietéticos de la madre, edad gestacional y hormonas se ha observado que también pueden influir en su composición³⁸.

Por otro lado, la cantidad de colesterol en la leche materna es de alrededor de 90-150 mg/L. El colesterol es un importante componente estructural de las membranas celulares; está presente en considerables cantidades en la mielina del sistema nervioso central durante el periodo más rápido de crecimiento del cerebro y funciona como sustrato de síntesis de ácidos biliares, lipoproteínas, vitamina D, hormonas, y oxisteroles que modulan la homeostasis del colesterol, lípidos y glucosa^{39, 40, 41, 42}.

Carbohidratos: Los carbohidratos en la leche materna están presentes en diversas formas incluyendo monosacáridos (como la Glucosa y Galactosa), disacáridos (como la Lactosa), oligosacáridos, glicoproteínas y glicolípidos⁴³. De todos ellos, la lactosa es el principal nutriente para la producción de energía ya que al romperse forman glucosa y galactosa, siendo estas fuentes las más utilizadas por el cerebro, corazón y sistema nervioso central⁴⁴. Además la galactosa puede ser utilizada por el infante para la síntesis de glicoproteínas o mucopolisacáridos y convertirse en glucosa en el hígado^{45,46}. La composición de todas las formas de carbohidratos de la leche materna también cambia durante la lactación y cambian con la alimentación materna, así como diversos factores genéticos relacionados al metabolismo y actividad enzimática^{43,46}. Muchos de los oligosacáridos están en forma libre mientras que otros están unidos a proteínas (glicoproteínas) por ejemplo lactoferrina, κ- caseína, anticuerpos o a carbohidratos más simples como la lactosa^{46,47}. La cantidad de oligosacáridos producidos es principalmente influenciada por determinantes genéticos⁴⁸.

Los oligosacáridos de la leche humana (**HMO** por sus siglas en inglés) son el tercer componente mayoritario en la leche humana después de la lactosa (55-70 g/L) y lípidos (16-39 g/L) (**Figura 1**). Gran cantidad de estos componentes están presentes en calostro (20-24 g/L) en comparación con la leche madura (12-14 g/L). A diferencia de la lactosa, el principal carbohidrato de la leche materna el cual es digerible, los HMOS, no lo son por el infante pero sí para cierto tipo de bacterias comensales tales como *Bacteroides*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* spp particularmente *Bifidobacterium infantis* (**Figura 1**), favoreciendo su desarrollo una vez que llegan al tracto gastrointestinal del neonato, protegiéndolo de la colonización de bacterias patógenas^{33,46,46, 49, 50}.

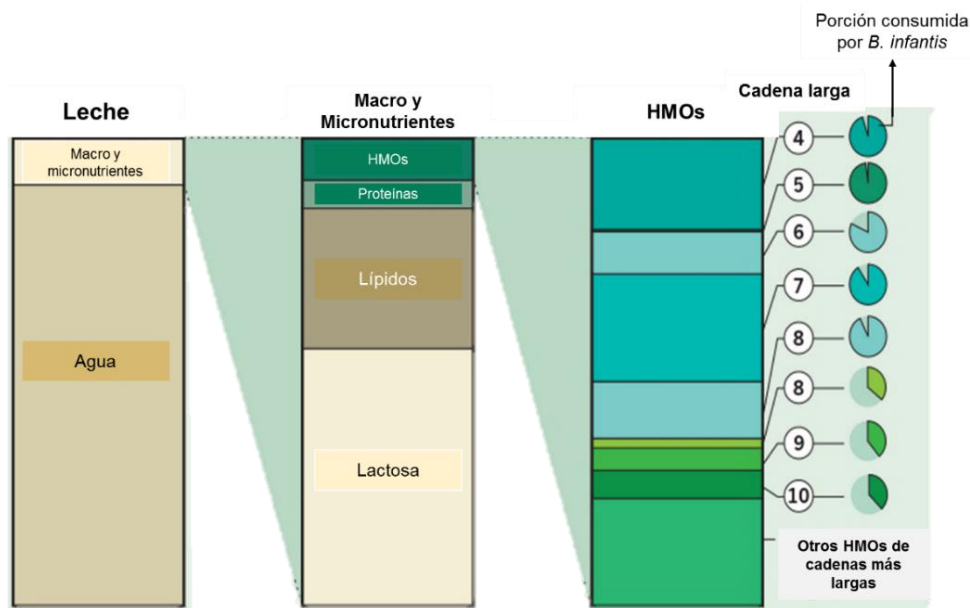


Figura 1. Composición de macromoléculas en la Leche Materna. El principal componente de la leche materna es agua, conteniendo además macro y micronutrientes, donde se incluyen lactosa, lípidos, proteínas y oligosacáridos de leche materna (HMO). Se muestra la abundancia de los HMOs de acuerdo a la extensión de la cadena y su consumo relativo por *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*). Modificado de Petherik A. Development; Mother's milk: A rich opportunity. 2010; S5-S7.

Los HMOS están conformados por diversos azúcares derivados de glucosa (**Glc**), Galactosa (**Gal**), N-acetilglucosamina (**GlcNAc**), fucosa (**Fuc**) y el ácido siálico N-acetilneuramínico (**Neu5Ac**). La combinación de estos azúcares, mediante enlaces glucosídicos genera más de 100 estructuras distintas de HMOS. Su biosíntesis en la glándula mamaria comienza con la formación de un centro o núcleo lactosa ($\text{Gal}\beta\text{1-4Glc}$) catalizada por la β -galactotransferasa en la presencia de α -lactalbumina. Con pequeñas excepciones, todas las estructuras de HMO contienen un núcleo de lactosa⁵¹. La lactosa puede ser enzimáticamente elongada por uniones $\beta\text{1-3}$ a lacto-N-biose o por enlaces $\beta\text{1-6}$ a N-acetillactosamina o por uniones a fucosa mediante enlaces $\alpha\text{1-2}$, $\alpha\text{1-3}$ o $\alpha\text{1-4}$ y/o residuos de ácido siálico por enlaces $\alpha\text{2-3}$ o $\alpha\text{2-6}$ a la posición terminal⁴³.

Una vez ingeridos por el infante lactante, los HMOs resisten a la acidez estomacal y a la degradación de las enzimas pancreáticas del infante⁵². Aproximadamente el 1% de los HMOs ingeridos se absorben alcanzando la circulación sistémica del infante y se excretan intactos en la orina⁵³. La mayoría de los HMOs son metabolizados por los microorganismos intestinales del infante o son excretados en las heces⁵⁴.

Dado que los HMO`s se absorben y son capaces de llegar a circulación sistémica, es probable que alcancen muchos órganos además del intestino, incluidos hígado y cerebro, así como el tracto respiratorio y el tracto urinario⁵⁵.

Por otro lado, sumado a la función nutricia y prebiótica, los HMO impiden la adhesión de patógenos como *Vibrio cholerae*, *Salmonella tyris*, *E.coli* enteropatogénica, *E.coli* enterotoxigénica y *Streptococcus pneumoniae*^{56,57,58}. Además, HMOs fucosilados inhiben la unión de *Campylobacter jejuni* a células epiteliales mientras que HMOS sialilados bloquean la adhesión de *E.coli* a enterocitos^{57,59}. Del mismo modo, los HMOs tienen funciones anti-fúngicas, impidiendo la invasión de células epiteliales neonatales por parte de *Candida albicans*⁶⁰. También estos oligosacáridos funcionan como agentes antimicrobianos. Recientemente se ha demostrado que, *Streptococcus agalactiae* no es capaz de proliferar en presencia de HMOs principalmente no-sialilados⁶¹.

Otras funciones incluyen regulación de apoptosis en las células epiteliales intestinales, al igual que su proliferación, diferenciación⁶², producción de glucocalix⁶³, y modulación de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β e IL-6⁶⁴, activación de linfocitos T⁶⁵, además de modular la respuesta inmune alérgica al disminuir la respuesta tipoTh2⁶⁶.

Nucleótidos: Los nucleótidos presentes en la leche materna representan aproximadamente 2-5% de los compuestos nitrogenados no proteicos³⁰. Promueven la proliferación de linfocitos, actividad de NK, activación de macrófagos y son mediadores en la producción de otros factores inmunomoduladores³⁰. La alimentación con fórmulas suplementadas con nucleótidos a infantes pretérmino y término mejoran su respuesta a inmunizaciones, promueven la maduración de linfocitos T y reducen el riesgo de diarrea, además de promover la síntesis de IgA e IgM en los infantes prematuros^{67,68}. Estudios en animales sugieren que los nucleótidos favorecen respuesta tipo Th1 y modulan la diferenciación y maduración de linfocitos T y B⁶⁷. Además, ayudan al desarrollo y modulación del sistema inmune gastrointestinal⁶⁹.

Factores que afectan la composición del calostro

La composición de la leche humana cambia en respuesta a varios factores, adaptándose a las necesidades del infante según su edad y otras características⁷⁰. Entre los factores que afectan la composición de calostro se encuentra la edad gestacional, la vía de nacimiento y el género del recién nacido. Existen diferencias en los compuestos bioactivos, macronutrientes, citocinas, enzimas, proteínas y factores inmunológicos en la leche materna de mujeres con partos pretérmino, término y de mujeres que dieron a luz vía vaginal y cesárea. Además, el contenido energético de la leche es diferente dependiendo del género del recién nacido. La leche de madres que dieron a luz niños tiene más grasa que la leche de mujeres que dieron a luz niñas⁷¹.

La leche de mujeres con infantes pretérmino es diferente de la leche de mujeres que llegaron a término. Los nacimientos pretérmino pueden afectar la concentración de algunos compuestos bioactivos de la leche materna⁷². Inicialmente, la leche pretérmino tiene concentraciones altas de proteínas, grasas, aminoácidos libres y sodio, sin embargo, van disminuyendo conforme al tiempo. Las concentraciones de lactosa en calostro, son relativamente bajas, pero van aumentando conforme al tiempo, en leche pretérmino el incremento de lactosa se produce más rápido. Los minerales no varían tanto debido al tiempo de gestación, excepto el calcio, el cual es más bajo en leche pretérmino y no incrementa conforme al tiempo, mientras que, el contenido de cobre y el zinc se encuentra más alto que en leche término y disminuye conforme al tiempo de lactación. La leche pretérmino también tiene altos niveles de sIgA, lactoferrina y lisozima y bajos niveles de leptina⁷³. Además, la leche pretérmino tiene altos niveles de adiponectina, un factor que reduce la producción de citocinas proinflamatorias.

Así como los factores solubles pueden ser afectados por diferentes condiciones del nacimiento y etapas de maduración de la leche, la frecuencia de aparición, así como las características fenotípicas de los leucocitos pueden también verse afectados. Jin y colaboradores⁷⁴ examinaron si algunas enfermedades atópicas como dermatitis, rinitis, asma, alergia a alimentos y la vía de nacimiento afectaban

las poblaciones de linfocitos en calostro humano. Encontraron que el número de células NK y de linfocitos T de memoria en calostro de madres atópicas es menor en comparación con madres sin atopias. En cuanto a la vía de nacimiento, encontraron que los números de linfocitos T CD4+ son menores en el calostro de madres con partos vía cesárea en comparación con madres que dieron a luz vía vaginal. Cabe añadir que, durante periodos de infección tanto de la madre o el infante la concentración de leucocitos en la leche materna incrementa regresando a condiciones basales una vez que la infección es curada⁷⁵.

Otros estudios también demuestran que la edad gestacional afecta la concentración y frecuencia de las poblaciones de leucocitos en leche materna⁷⁶. En calostro la frecuencia relativa de linfocitos T no citotóxicos y linfocitos B disminuyen conforme aumenta la edad gestacional⁷⁶.

Con lo que respecta a la microbiota, la colonización del intestino neonatal es un proceso que está influenciado por varios factores ambientales y factores del hospedero⁷⁷. A lo largo del desarrollo del neonato, existen factores prenatales (exposición a microorganismos en placenta), factores neonatales (vía de nacimiento y edad gestacional) y factores postnatales (como la alimentación con leche materna o fórmula láctea, locación geográfica o dieta materna) que influyen el desarrollo de la microbiota neonatal⁷⁸. Por ejemplo, los infantes que nacen vía vaginal entran en contacto la microbiota vaginal e intestinal materna, lo cual resulta en la colonización del intestino neonatal por microorganismos asociados a la vagina tal como *Lactobacillus* y *Prevotella*⁷⁸. Por el contrario, infantes que nacen vía cesárea no tienen una exposición directa a los microorganismos maternos sino con microorganismos de la piel materna o el ambiente hospitalario⁷⁸.

Componentes Inmunológicos de la Leche Materna

Dentro de los elementos inmunes de la leche materna encontramos componentes solubles y componentes celulares. Cada uno tiene funciones específicas en la protección del neonato, sin embargo, se pueden relacionar entre sí, potenciando esta protección. Estos componentes, además, ayudan a la maduración del sistema inmune neonatal.

Componentes Solubles.

Algunas de las funciones de los componentes solubles son la protección contra patógenos, regulación del ambiente bioquímico, propiciar el desarrollo y crecimiento mediante factores tróficos y participar en mecanismos de regulación del metabolismo en el recién nacido. En este grupo de moléculas encontramos Anticuerpos de la clase IgA, citocinas, factores de crecimiento, entre otras.

1. Anticuerpos

Además de una mezcla única de nutrientes y proteínas antimicrobianas que influyen en la microbiota neonatal, el calostro proporciona abundantes cantidades de anticuerpos de todos los isotipos (IgM, IgG, IgA e IgE), sin embargo, las S-IgAs son la inmunoglobulina predominante, constituyendo entre el 80% al 90% de los mismos^{37, 79}. Estos últimos, son reconocidos por el receptor Fc neonatal³ (**FcRn**) de los enterocitos del intestino facilitando su transcitosis incorporándolos al cuerpo del lactante^{80, 81}. La disminución en la cantidad de anticuerpos en la leche materna refleja que el sistema inmune del neonato se vuelve más competente⁸².

En los primeros días de nacido, la protección a patógenos invasivos en las superficies de la mucosa depende en gran medida de los anticuerpos de la leche materna. En concordancia con ello, en infantes alimentados con leche materna la IgA se encuentra en las heces al segundo día del nacimiento en comparación con los infantes alimentados con fórmula³³. Los anticuerpos de la leche materna son resultado de la estimulación antigénica materna, principalmente en mucosa intestinal y del árbol bronquial³⁷. Los mecanismos de transporte de estos anticuerpos desde las mucosas intestinales o bronqueoalveolares hasta la glándula mamaria se denominan vía enteromamaria y broncomamaria, respectivamente³⁷. Estos anticuerpos van dirigidos a agentes infecciosos a los cuales la madre estuvo expuesta en el periodo perinatal. Por ejemplo, la inmunización materna con la vacuna para *Neisseria meningitidis* genera anticuerpos S-IgA específicos incluso hasta 6 meses después del parto⁸³.

La estabilidad de S-IgA se debe a la resistencia a enzimas proteolíticas gastrointestinales comparada con los dímeros de IgA u otros isotipos de

inmunoglobulinas. Dentro de las S-IgAs, la relación entre los subtipos IgA1 a IgA2 en calostro suele ser similar⁸⁴. Cabe resaltar que la IgA2 es más resistente que IgA1 a las proteasas producidas por bacterias como *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* los cuales son patógenos que afectan las mucosas. Además, la leche materna contiene anticuerpos S-IgA contra estas enzimas, protegiendo los anticuerpos S-IgA³⁷.

Una de las principales funciones de los anticuerpos S-IgA en leche, es la neutralización de microorganismos y macromoléculas; con ello se limita la unión del patógeno a los epitelios modulando la colonización temprana de mucosas por bacterias en el tracto gastrointestinal y vías respiratorias del lactante. Por lo anterior, se considera que la especificidad de estos anticuerpos maternos moldea la mucosa del recién nacido⁷⁹.

2. Citocinas

Como ejemplo de estos componentes se encuentran las citocinas proinflamatorias, cuya presencia en leche materna se asocia al proceso de parto, se encuentran en bajas concentraciones y disminuyen conforme transcurre el periodo de lactancia^{85,86}. Citocinas como interleucina (IL)-6 se encarga de la estimulación de la respuesta de fase aguda y activación de linfocitos B para producción de inmunoglobulinas^{87,88,89}; IL-8 contribuye al reclutamiento y tráfico de leucocitos, como neutrófilos y a la maduración del epitelio intestinal neonatal^{90,87, 91}. Diversos estudios muestran que estas citocinas sobreviven a la digestión y se absorben rápidamente en el intestino por lo que tienen efectos funcionales en otros compartimientos de los neonatos⁹².

Además de citocinas con actividad proinflamatoria, la leche materna contiene moléculas con actividad antiinflamatoria, entre éstas IL-10 y el Factor de Crecimiento Transformante (TGF)- β . IL-10 es una de las principales citocinas inmunomoduladoras descritas. Puede mediar tanto señales parácrinas como autócrinas y puede ser inducida por catecolaminas^{93, 94}. Inhibe la producción de citocinas inflamatorias como IL-2, causando disminución es la respuesta Th1 y en la producción de IFN- γ ; además promueve la actividad fagocítica, incrementando

la eliminación de restos celulares en el sitio de inflamación^{95, 96}. Uno de los mecanismos moleculares en el cual IL-10 participa está relacionada con la molécula co-estimuladora CD28, involucrada en la interacción entre los linfocitos T efectores y las células presentadoras de antígeno (**CPA**). Además, es capaz de inhibir la diferenciación y maduración de células dendríticas y cumple funciones importantes en la síntesis de IgA^{97, 98, 99}. En modelos animales, la inhibición temprana de IL-10 interrumpe la tolerancia hacia microorganismos comensales y favorece el desarrollo de enfermedades inflamatorias como enterocolitis^{30, 100}.

Por otro lado, TGF- β regula la homeostasis celular y suprime respuestas inmunes¹⁰¹. Es absorbida rápidamente por los tejidos neonatales, e inhibe la liberación de citocinas pro-inflamatorias favoreciendo la tolerancia a microorganismos comensales¹⁰¹. Su producción en las mucosas induce los anticuerpos de isotipo IgA en los centros germinales. Del mismo modo, TGF- β regula la activación y proliferación de células plasmáticas y facilita la eliminación de linfocitos B inmaduros¹⁰¹. Además, TGF- β modula la expresión de moléculas del MHC-II en las células epiteliales intestinales y ayuda a la remodelación del tejido intestinal¹⁰¹. Su disminución en recién nacidos se ha asociado a enfermedades como enterocolitis necrosante (**NEC**) y sepsis¹⁰².

3. Factores de crecimiento y adipocinas

Como componentes solubles en la leche materna, los factores de crecimiento también juegan un papel importante. Por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (**EGF**) propicia la estimulación, proliferación y maduración de células epiteliales del tracto gastrointestinal del recién nacido, la eritropoyetina (**EPO**), además de contribuir al desarrollo intestinal, actúa como un importante regulador de la eritropoyesis al promover la proliferación y diferenciación de las células progenitoras eritroides¹⁰³, el factor de crecimiento endotelial vascular (**VEGF**) promueve angiogénesis y reparación tisular en el neonato y el factor estimulante de colonias de granulocitos (**G-CSF**) funciona como un factor trófico en los intestinos del recién nacido¹⁰⁴. La leche materna también contiene adipocinas como adiponectina, una adipocina antiinflamatoria que ayuda a la reducción y

control del IMC del recién nacido^{105, 106}; leptina que contribuye a la regulación del almacenamiento energético, apetito e IMC neonatal^{107, 108, 109} y resistina que participa en la regulación de la sensibilidad a la insulina y el mantenimiento de la homeostasis metabólica del neonato^{108, 110}. La producción de adipocinas por parte de los adipocitos se ve afectada por factores como hipoxia, estrés oxidativo y factores proinflamatorios, así como por presencia de citocinas como TNF e IL-6^{111, 112}. La expresión desregulada de estos componentes causada por el exceso de adiposidad y la disfunción de los adipocitos, se ha relacionado con la patogénesis de diversos procesos de enfermedad a través de respuestas inmunes alteradas^{112, 113}.

Componentes Celulares

La glándula mamaria es un sitio efector del sistema inmune mucoso materno. La mayoría de las células inmunes en leche se desarrollan en sitios efectores del sistema inmune mucoso-materno tal como las Placas de Peyer (PP) del intestino o las amígdalas, por lo que, la mayoría de las células inmunes tienen marcadores distintivos de origen mucoso^{3, 114, 115}.

De los tres tipos de leche, el calostro es el que contienen altas concentraciones de células maternas de varios tipos, incluyendo células epiteliales, linfocitos B y T, células NK, células dendríticas y macrófagos. En las semanas siguientes al nacimiento, la concentración de células inmunes de la leche materna disminuye¹¹⁶. Dependiendo de la fase y estado de lactación, una variedad de leucocitos está presentes en calostro ($\approx 4 \times 10^9$ células/mL) y en leche madura ($\approx 10^8$ - 10^9 células/mL)^{91, 117}. Se estima que en un día, un neonato amamantado consume en promedio 10^8 células inmunes sin embargo con infecciones locales o sistémicas en la madre o el bebé las transferencia celular incrementa hasta 10^9 células por día¹¹⁸. Macrófagos (55-60%) y Neutrófilos (30-40%) están en mayor proporción que los Linfocitos (5-10%, donde los linfocitos T representan >80% y los linfocitos B 4-6%)³⁰.

Muchas de estas células se incorporan al tejido mucoso intestinal del neonato y probablemente a otros tejidos³. Numerosos estudios soportan, que la transferencia de células maternas al infante ocurre especialmente en la lactancia temprana, periodo en el cual la concentración de células madre e inmunes (como linfocitos T) es muy alta en calostro y en leche materna temprana³. Se ha sugerido que, la transferencia de células de la leche materna ocurre antes del cierre del intestino neonatal, lo que podría favorecer eficiente y efectivamente el desarrollo y maduración del sistema inmune mucoso o sistémico con implicaciones a corto y largo plazo en enfermedades infecciosas en neonatos³. En modelos murinos, células en la leche materna como TCD4+ viables son capaces de establecerse en el timo neonatal las cuales cumplen un rol importante en la “educación” de linfocitos T CD8+¹¹⁹. Esto podría ser un mecanismo de protección al neonato contra patógenos como micobacteria u otros patógenos intracelulares¹²⁰. Cabe resaltar que linfocitos T citotóxicos de la leche materna son capaces de localizarse en las PP de lactantes murinos¹²¹. Esta transferencia de células maternas a través de la leche materna mejora la respuesta inmune temprana del neonato¹²².

Linfocitos T en leche materna

Los linfocitos de la leche materna se componen principalmente de una población celular de memoria extralinfoide¹¹⁴. La mayoría de estos, son Linfocitos T (>80%), tienen memoria efectora¹²³ y son distintos en abundancia y respuesta en comparación a los encontrados en sangre periférica. Además, la alta proporción de linfocitos TCR $\gamma\delta$ +CD8+ (expresan L-selectina, $\alpha 4\beta 7$ integrina y la molécula de adhesión celular adhesina mucosal-1) comparado con la sangre periférica sugiere que estos linfocitos T citotóxicos, viajan desde las mucosas maternas a la glándula mamaria^{114, 123}. Por otro lado, los linfocitos CD4+ están presentes en su forma activada expresando marcadores como CD40L, sCD30, CD62L, CCR7, receptor de IL-2, antígeno linfocitario de la mucosa humana 1 (HML-1 o CD103) o activación tardía de la proteína-1 al igual que son CD45RO+ una proteína de superficie asociada con la memoria inmunológica^{29,114, 124, 125}. Cabe resaltar que la proporción de células inmunes activadas es mayor en leche materna que en sangre periférica¹¹⁵.

Se ha sugerido que los linfocitos T transferidos pueden compensar la función inmune de linfocitos T neonatales y promover su maduración. Además, las células mieloides maternas podrían ayudar a compensar la baja capacidad de presentación antigénica de las correspondientes neonatales³⁰. En modelos animales, los linfocitos derivados de la leche pueden atravesar el intestino neonatal, sugiriendo que su influencia se extiende hasta el intestino¹²⁶. Cuando los linfocitos de sangre periférica son expuestos a la leche materna, presentan diferencias fenotípicas, las cuales incluyen una disminución en células CD4+ y CD8+, un incremento en las células NK y un incremento en la producción de IFN- γ ^{30, 127}.

Cabe resaltar que los neonatos que tienen una alimentación exclusiva de leche materna tiene un tamaño mayor de timo que aquellos que fueron alimentados parcialmente con leche materna o con formula láctea. Además, Jeppesen y colaboradores¹²⁸ encontraron que el porcentaje de CD4+ y CD8+ se reduce en infantes a los cuales se les interrumpe la lactancia materna a los 8 o 4 meses, respectivamente, además de que el aumento de linfocitos T CD4+ correlaciona con la frecuencia de amamantamiento por día.

La mayoría de los linfocitos de la leche materna expresan marcadores de *homing* como integrina α E (CD103), integrina β 7, CD49d y CCR9 sugiriendo que se probable procedencia es el GALT (tejido linfoide asociado a intestino) y posteriormente migran a la glándula mamaria^{114, 129}. Además los linfocitos T $\delta\gamma$, que son comúnmente encontrados en la mucosa intestinal, son abundantes en la leche materna comparada con la sangre periférica¹³⁰.

Linfocitos Treg en calostro

Recientemente Cébulo y colaboradores¹³¹ demostraron la presencia de linfocitos Treg CD25++CD127-, que presentan altos niveles de expresión de las moléculas CD25, CD152, CD279 y TGF- β que aquellos presentes en sangre periférica sugiriendo que los linfocitos Treg de calostro ejercen una capacidad mayor de inmunomodulación. Además, expresan el factor de transcripción FoxP3 y CD45RO.

También se demostró que las Treg encontradas en el calostro no tienen asociación con las Treg presentes en sangre¹³¹, por lo cual se piensa que las Treg no solo pueden provenir de sangre periférica como por ejemplo la mucosa intestinal y posteriormente se movilizan a la glándula mamaria^{123, 129}. Este fenotipo celular puede reflejar parte de los efectos tolerogénicos de la leche materna en los neonatos e infantes hacia antígenos maternos o de la microbiota. Es posible que los linfocitos Treg de la leche materna reflejen ciertas propiedades tolerogénicas, teniendo una función fundamental en el neonato al reducir la respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal¹³².

De manera general, los linfocitos Treg están involucrados en el mantenimiento y establecimiento de la tolerancia inmunológica mediante el control de respuestas hacia antígenos tanto propios, derivados de bacterias comensales, alimenticios o del ambiente^{131, 133}.

Dos principales categorías de linfocitos Treg han sido descritas. La primera son aquellas células linfocitos CD4+CD25+ provenientes del timo (tTreg) que comprenden 1-10% de la población de linfocitos CD4+ en adultos y ratones sanos¹³⁴. Además de ellas existe una población más que se genera a partir de la estimulación de antígenos específicos en los tejidos periféricos (pTreg). Ambas poblaciones secretan citocinas como IL-10 y TGF- β . Por lo tanto, los linfocitos Treg se generan a partir del reconocimiento de antígenos propios (en el timo) y extraños (en los órganos linfáticos periféricos)¹³⁵.

Mecanismos de inmunoregulación

Existen diferentes mecanismos por los cuales los Treg cumplen su función supresora que incluyen la secreción de citocinas como TGF- β , IL-10 y IL-35¹³⁶, la supresión contacto dependiente y la modificación funcional o muerte de linfocitos T efector y CPA. Otro mecanismo involucra el secuestro de citocinas a través de receptores como CD25, siendo que la ausencia de su ligando, IL-2, en linfocitos T efector puede inducir apoptosis¹³⁷.

Moléculas como CD39 y CD73 catalizan juntas la formación de adenosina a partir de ATP o ADP, molécula que inhibe la proliferación de linfocitos T efectores a través del receptor de adenosina A₂¹³⁸ (**Figura 2**).

Por otra parte, pueden realizar su actividad inmunoreguladora por medio del contacto célula-célula¹³⁹. Esta comunicación estrecha puede inducir la liberación de moléculas inductoras de la apoptosis (como granzimas y perforinas), o a la inducción de señales inhibitoras de la proliferación de linfocitos T y síntesis de IL-2¹³⁹; y sobre CPA, reducir la expresión de moléculas involucradas en la coestimulación como CD80/CD86 para formar la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa, que cataboliza el aminoácido triptófano a quinureninas el cual es tóxico para las linfocitos T, disminuyendo su proliferación y secreción de citocinas; ambos mecanismos dependen de la expresión de CTLA-4 o CD152 por Treg^{139,140}. Otra molécula que media esta interacción es la molécula coestimuladora de muerte programada 1 (PD-1) o CD279. PD-1 que inhibe la enzima PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa) y en consecuencia la vía Akt evitando el crecimiento y proliferación celular.

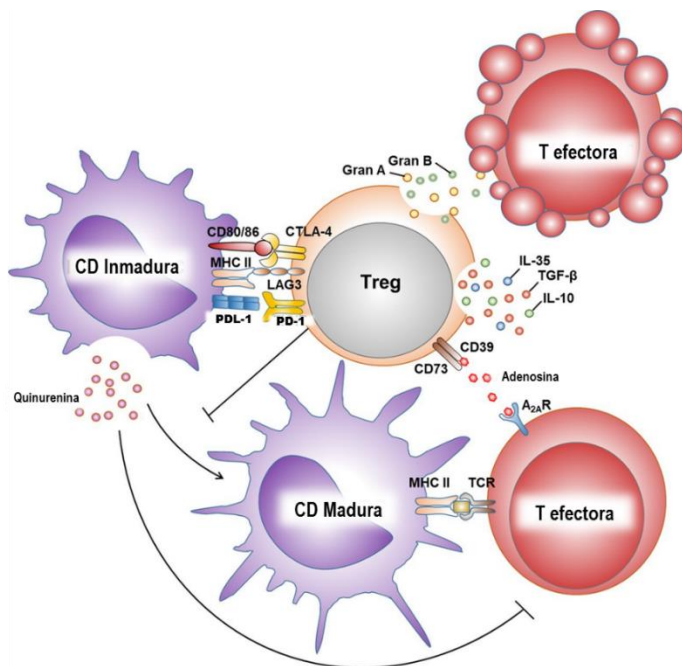


Figura 2. Mecanismos de inmunoregulación de los Linfocitos Treg. Los linfocitos Treg emplean diversos mecanismos para generar una respuesta tolerogénica. Entre ellas se encuentra la inhibición contacto dependiente por células como CTLA-4 y PD-1. Además, las Treg suprimen las respuestas de linfocitos T efectores al secretar citocinas inmunomoduladoras e interrumpir las respuestas metabólicas de linfocitos T efectores, de modo que su proliferación y activación se ven afectadas. Al igual los Treg interactúan con las CD modulando su función y maduración. Finalmente, los Treg secretan perforinas y granzima B e inducen apoptosis de los linfocitos T.

Microbiota en Leche Materna

Dentro de los componentes celulares de la leche materna se encuentra una gran cantidad de bacterias, siendo la principal fuente postnatal de bacterias para el intestino del neonato durante los primeros momentos de vida¹⁴¹. Variaciones en la composición de la microbiota se han asociado a un incremento en el riesgo de enfermedades inmunes e inflamatorias tal como desordenes alérgicos, enfermedad celiaca sobrepeso y obesidad^{142, 143}. La colonización microbiana intestinal ocurre poco después del nacimiento y cumple un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune¹⁴⁴. La lactancia materna a través de una variedad de mecanismos sinérgicos, contribuye a la apropiada selección de bacterias comensales en el sistema gastrointestinal del neonato y a la maduración de órganos linfoides primarios y secundarios^{3, 145, 146}.

Del mismo modo, la transferencia de bacterias comensales ayuda en el desarrollo de una microbiota intestinal adecuada al proporcionar bacterias como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*¹⁴⁷. Estas bacterias favorecen la generación de linfocitos Treg y de esta manera previenen y disminuyen enfermedades inflamatorias neonatales, tal como enterocolitis necrosante o sepsis^{148, 149, 150, 151}.

Inmediatamente después del nacimiento, el intestino del neonato se coloniza rápidamente; durante este periodo postnatal microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos se establecen en el intestino. La colonización del intestino del neonato con más de 400 especies de bacterias comensales contribuyen al homeostasis inmune, estableciendo una relación simbiótica entre las bacterias comensales, las células epiteliales intestinales y tejidos linfoides^{152, 153}. Las bacterias intestinales no sólo estimulan células del sistema inmune, también influyen en componentes de la barrera epitelial como en el desarrollo de microvellosidades^{154, 155} y uniones estrechas¹⁵⁶. Estas bacterias además favorecen la secreción de mucina por parte de las células epiteliales caliciformes para formar el glicocálix que funciona como barrera física y antibacterial. Del mismo modo, las bacterias intestinales pueden estimular células epiteliales y células de Paneth lo que favorece la secreción péptidos antimicrobianos en el glicocálix y lumen

intestinal, lo que ayuda a regular la colonización de bacterias intestinales^{154, 157}. Cabe resaltar que la secreción de IgA, procesos de inflamación y homeostáticos como la proliferación y apoptosis están influenciados por estas bacterias^{158, 159, 160, 161}. Las funciones de las bacterias comensales en el sistema inmune intestinal son mediadas en gran medida por TLRs y la capa de células epiteliales intestinales o IECs (compuesta de enterocitos, células enteroendócrinas, células caliciformes y células de Paneth¹⁶²) capaces de distinguir entre bacterias comensales y bacterias patógenas. A través de la interacción de bacterias comensales con los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) de las células dendríticas se provoca la secreción de citocinas (**Figura 3**) lo cual crea un microambiente que permite que las linfocitos Th naive (Th0) generen un balance de subclases de linfocitos Th (Th1, Th2, Th17 y Treg¹⁶³).

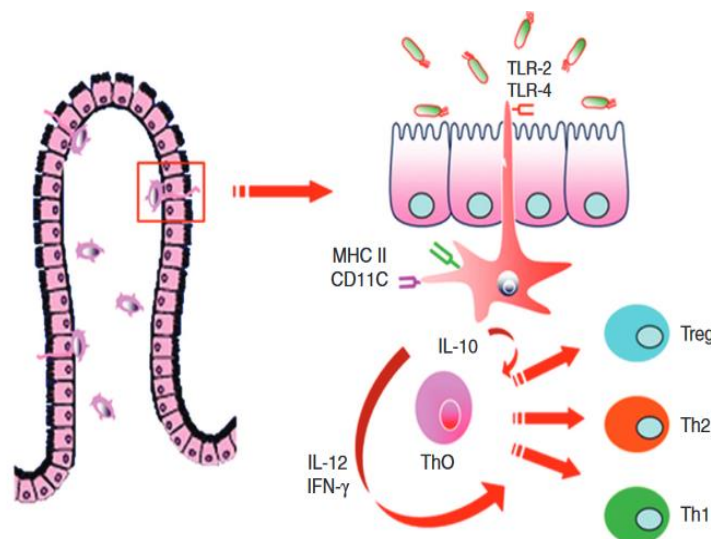


Figura 3. Las bacterias comensales provocan respuesta de Linfocitos T. Las bacterias comensales provocan respuesta de linfocitos T vía células dendríticas (CD) por unión a TLR2/TLR4 en la superficie de las dendritas penetrantes. La microbiota comensal induce la expresión de moléculas de activación (MHC II y CD11c) de CD y secreción de citocinas (IL-10, o IL-12, INF- γ) que activan linfocitos Th naive (Th0) para su maduración y diferenciación a perfiles Th1, Th2, Th17 y Treg. Modificado de: Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. 2014. 1-7

Existen bacterias que coevolucionan con la glándula mamaria las cuales tienen propiedades específicas que favorecen su desarrollo en el ambiente mamario durante la lactación¹⁶⁴. Los ductos de la glándula mamaria son excelentes soportes físicos permitiendo la adherencia de estas bacterias y además los nutrientes presentes en la leche materna (como la lactosa y galactosa o HMOs)

son una importante fuente de energía, favoreciendo el crecimiento y desarrollo de las bacterias presentes en la leche materna¹⁶⁴. Cabe resaltar que el seno materno está compuesto de tejido adiposo que podría proveer de nutrientes a las bacterias que residen en la glándula mamaria¹⁶⁴. Estas bacterias interactúan entre sí, lo que puede generar producción de bacteriocinas, señalización célula-célula y una relación simbiótica impidiendo el desarrollo de bacterias patógenas. Cambios anatómicos y fisiológicos en la glándula mamaria, incluyendo los ductos, areola y pezones durante el embarazo facilitan la formación de microbiota mamaria¹⁶⁴.

A pesar que algunas especies bacterianas encontradas en la piel y en la leche materna se comparten, existen géneros bacterianos que son únicos en cada compartimiento¹⁶⁵. Por ejemplo, *Bifidobacterium* es un género anaerobio estricto y por lo tanto, la piel es una fuente improbable de esta bacteria que se encuentra en la leche materna¹⁶⁶. La presencia de DNA de *Bifidobacterium longum* en heces maternas y neonatales y en leche materna dentro del mismo par madre-neonato ha sido reportado¹⁶⁷. Además, mediante técnicas para la identificación de DNA, como la pirosecuenciación, géneros anaerobios obligados asociados al intestino tal como *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides* y miembros de la clase Clostridia (*Blautia*, *Clostridium*, *Collinsella* y *Veillonella*) también han sido encontrados en heces materna y neonatales, así como en la leche materna. Se ha reportado que, géneros como *Lactobacillus* y *Enterococcus* aislados de la leche materna son genotípicamente diferentes de aquellos aislados de la piel dentro de la misma especie bacteriana y un mismo hospedero¹⁶⁵.

Estudios de aislamiento de bacterias por cultivo han demostrado la transferencia de bacterias de distintos géneros (como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) del tracto gastrointestinal materno al intestino del neonato^{168, 169, 170}, del tracto gastrointestinal materno a la leche materna^{171, 172}, de la leche materna a el tracto gastrointestinal neonatal^{173, 174} y del tracto gastrointestinal materno a la leche y al tracto gastrointestinal del neonato^{175, 176}. Estos estudios demuestran que algunas bacterias, incluyendo anaerobias obligadas, pueden ser transferidas verticalmente (**Tabla 2**).

Hasta ahora existen tres posibles mecanismos por los cuales las bacterias llegan al seno materno además de a través de la piel y el pezón: 1) Translocación a través de las membranas mucosas de la boca, intestino, tracto urogenital y piel, 2) Entrando por medio del torrente sanguíneo vía cavidad oral y 3) por medio de CD intestinales, nódulos linfáticos mesentéricos y pasando por el torrente sanguíneo(vía entero linfática mamaria)¹⁶⁴.

Vía Enterolinfática Mamaria

Es la vía por la cual ciertas bacterias seleccionadas de la microbiota intestinal pueden acceder a la glándula mamaria (**Figura 4**). Aunque es una vía aún en estudio, algunos estudios han planteado las bases para tal translocación fisiológica.

Este mecanismo involucra a las células dendríticas (CD) y células CD18+^{178, 179, 180} (como macrófagos), las cuales pueden ser capaces de penetrar el epitelio intestinal y absorber bacterias no patogénicas del lumen intestinal y subsecuentemente llevarlas a otras locaciones, incluyendo la glándula mamaria lactante¹⁸¹. Las CD son capaces de abrir las uniones estrechas entre las células epiteliales del intestino, y mediante las dendritas tomar directamente a las bacterias, preservando la integridad de la barrera intestinal mediante la expresión de proteínas de unión estrecha (tal como Ocludina, Claudina 1 y ZO-1)^{165, 177}. Aunado a ello, se demostró que las CDs intestinales pueden retener bacterias comensales vivas por varios días en los nódulos linfáticos mesentéricos. Una vez dentro de las células del sistema inmunes, las bacterias intestinales pueden propagarse a otros lugares mediante la circulación linfática perteneciente al MALT^{165, 177}. Las células estimuladas con antígeno se mueven de la mucosa intestinal a colonizar distintas superficies mucosas, tal como el tracto respiratorio o genitourinario, glándulas salivales y lagrimales además de la glándula mamaria¹⁷⁷. Es conocido que, durante el periodo de lactancia, la migración de células del sistema inmune a la glándula mamaria es un proceso regulado por las hormonas lactogénicas¹⁸². Este proceso responsable de la abundancia de células en la leche materna. Por lo que hay que recalcar que existe migración de células inmunes

intestinales a la glándula mamaria durante el embarazo y la lactación, como sucede con los linfocitos B productores de IgA¹⁸³.

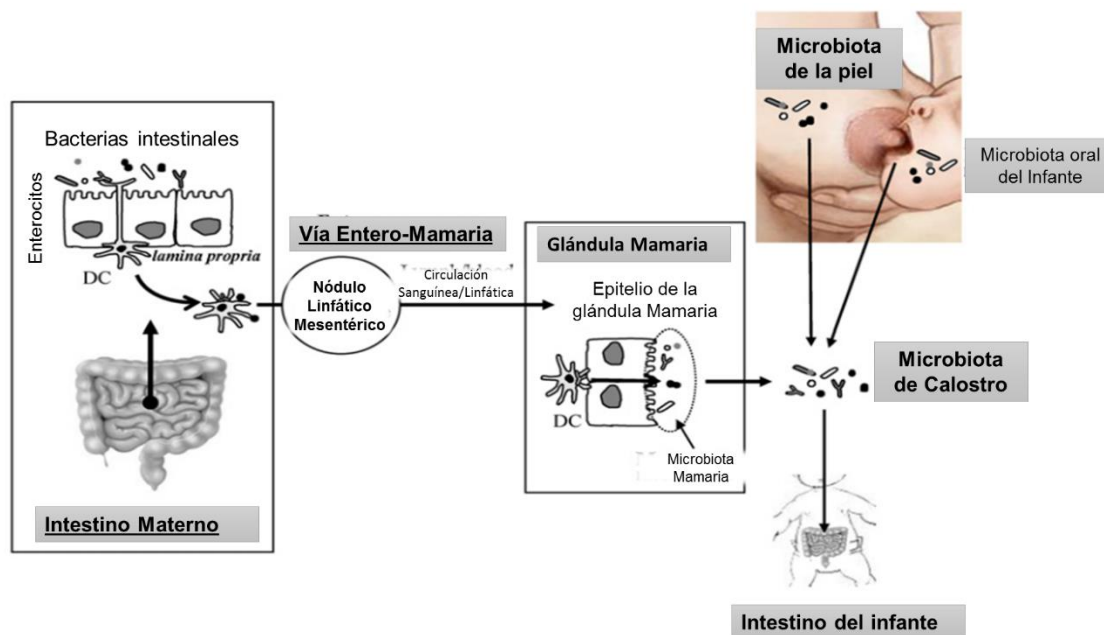


Figura 4. Vía entero-linfática mamaria. Potencial fuente de bacterias presentes en la leche materna. CD: Células Dendríticas. Modificado de Fernández L. The human milk microbiota: Origin and potencial roles in health and disease. 2013. 1-10

Resultados *in vivo* e *in vitro* refuerzan la hipótesis de que algunas bacterias de la leche materna provenientes del intestino materno pueden llegar a la glándula mamaria a través de la vía endógena mediante células dendríticas y macrófagos^{165, 177}. Langa y colaboradores¹⁸⁴ demostraron que al exponer células dendríticas inmaduras de ratón a dos cepas bacterianas aisladas de leche materna favorece su estimulación y expresión de dos marcadores de activación de células dendríticas: MHC de clase II y la proteína B7.2; por lo que la maduración de células dendríticas es un proceso que requiere bacterias vivas, ya que las bacterias muertas o partículas inertes (como perlas de látex) no pueden activar células dendríticas incluso si son fagocitadas^{165, 177}. Por otro lado, bacterias como *L. gasseri* CECT 5715 aislada de la leche materna muestra gran afinidad de unión a las células dendríticas y capacidad de cruzar a través de una monocapa de células Caco-2 mediante un mecanismo regulado por células dendríticas. Cabe resaltar que la frecuencia de fenotipos de células dendríticas y de células CD14+CD11c+ es menor en circulación durante la lactancia¹⁶⁷. Esto contrasta con

otros estudios en donde se muestra que el número de células dendríticas en circulación disminuye a final del embarazo y pueden reflejar una migración celular hacia el intestino o la glándula mamaria¹⁶⁷.

Otro estudio mostró que la translocación de bacterias del intestino al nódulo linfático mesentérico y glándula mamaria ocurre durante al final del embarazo y lactancia en ratones¹⁶⁷. Además, las células de la leche materna que contienen un número de bacterias viables y DNA bacteriano, son encontradas también en células mononucleares de sangre periférica^{165, 177}. Perez y colaboradores¹⁶⁷ mostraron que bacterias de los géneros *Streptococcus* y *Bifidobacterium* están presentes en células mononucleares de la leche y en sangre periférica; por lo que tanto las bacterias como los productos derivados de ellas son transportados a la glándula mamaria lactante dentro de células mononucleares.

Además, estudios clínicos en humanos han indicado que la ingesta de cepas bacterianas específicas por vía oral a dosis determinadas, tienen una importante función en la prevención o mejoría de enfermedades extraintestinales, tales beneficios difícilmente podrían darse si estas bacterias estuvieran confinadas únicamente en el intestino^{165, 177}.

Muchos son los cambios fisiológicos y anatómicos que ocurren durante el embarazo y la lactancia que proveen condiciones adecuadas para el desarrollo del feto y posteriormente al neonato¹⁶⁵. Estos cambios involucran cambios en todos los sistemas, incluyendo el cardiovascular, respiratorio, genitourinario y digestivo. Tales cambios favorecen la translocación de bacterias durante el final del embarazo y el inicio de la lactancia¹⁶⁵ (**Figura 5**). Cambios en el sistema cardiovascular son caracterizados por un estado de vasodilatación progresiva y generalizada, además ocasiona el aumento del volumen sanguíneo, volumen sistólico, gasto cardíaco, frecuencia cardíaca, flujo sanguíneo a varios órganos (por ejemplo, el útero riñones, tracto gastrointestinal, piel y mamas), angiogénesis y la concentración sanguínea de factores de coagulación y leucocitos¹⁶⁵. Las hormonas inducen cambios en la cavidad oral durante el embarazo ya que afectan el pH y la microbiota bucal. Los principales efectos en sistema gastrointestinal son

asociados con el desplazamiento de los órganos abdominales por el crecimiento del útero y la motilidad disminuida debido al efecto de la progesterona en la contractilidad del músculo liso¹⁶⁵, lo que causa un incremento en el tiempo de vaciamiento gástrico; mientras que una disminución en la secreción gástrica con lleva a un pH gástrico más básico. Además, uno de los cambios más drásticos al final del embarazo y al inicio de la lactancia es un aumento importante en el tamaño y complejidad del intestino materno¹⁶⁵, por lo que el tracto digestivo es caracterizado por un debilitamiento en las barreras contra el crecimiento bacteriano, aumento en la permeabilidad y peristalsis reducida, estos factores están estrechamente asociados con la translocación bacteriana¹⁶⁵.

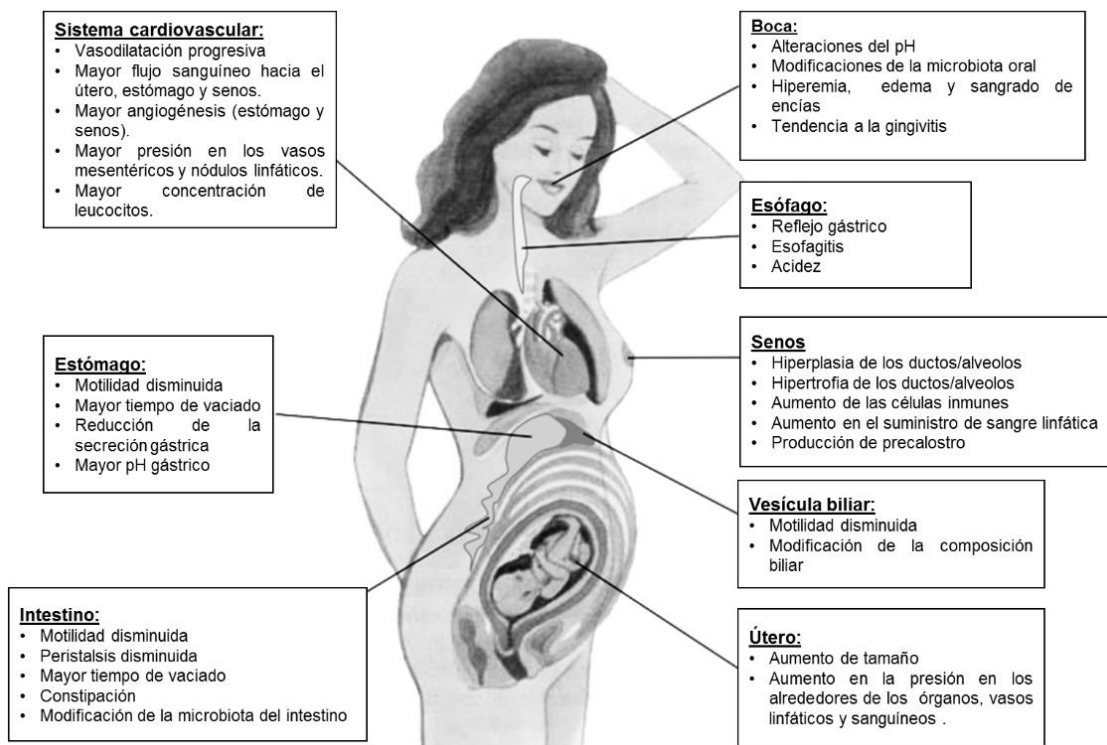


Figura 5. Adaptaciones fisiológicas del cuerpo durante el embarazo que pueden favorecer la translocación bacteriana. Modificado de Rodríguez JM. The origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation? 2014. 779-782.

***Bifidobacterium* en el intestino**

Es un género gram-positivo, catalasa negativa, inmóvil y no forma esporas, además, son anaerobias obligadas, en parte anaerobias facultativas, pertenecientes al phylum de Actinobacteria¹⁸⁵. *Bifidobacterium* representa uno de los miembros dominantes de la microbiota adulta intestinal, pero su predominio es incluso mayor en infantes, especialmente durante la lactancia¹⁸⁶. Es uno de los primeros microorganismos en colonizar el intestino y cumple funciones como metabolizar componentes de la dieta o en la maduración del sistema inmune innato y adaptativo (modulando vías específicas)^{185, 187}. Las bifidobacterias ejercen su actividad inmunomodulatoria principalmente en el colon y en la parte distal del íleon, donde hasta el 46% de las PP están localizadas¹⁸⁸.

El género *Bifidobacterium* actualmente incluye 59 diferentes taxones, 5 de los cuales han sido aislados de muestras fecales del intestino humano^{78, 189, 190}. Entre las especies que son identificadas en humano es posible distinguir entre aquellos que son encontrados en intestino de adultos (como *B.adolescentis* y *B.catenulatum*) y en infantes alimentados con leche materna (como *B.bifidum*, *B.breve* y *B.longum* subsp. *Infantis*)¹⁸⁶. Cabe señalar que especies como *B.adolescentis* son encontradas en infantes por lo que no existe una división estricta entre las especies de bifidobacterias que pertenecen a un adulto y al infante; más bien indica que existe una transferencia vertical de especies madre a hijo¹⁸⁶.

Múltiples son los mecanismos por los que las bifidobacterias se establecen e interactúan con el hospedero. Los seres humanos carecen de diversas enzimas glucolíticas que rompen a los HMOs por lo que estos glicanos llegan al colon intactos⁴³. El crecimiento de *Bifidobacterium* se debe al efecto prebiótico de estos glicanos libres y compuestos en la leche materna. Ward y colaboradores^{49, 191} fueron los primeros en demostrar el crecimiento selectivo de especies de bifidobacterias en contacto con HMOs in vitro. Posteriores estudios han confirmado que solo ciertas especies de bifidobacterias consumen HMOs de manera importante. *B.lomgum*. subtp. *Infantis* (*B.infantis*) y *B.breve* consumen

preferentemente pequeños HMOs fucosilados o sialilados, por lo que solo cierto tipo de cepas de bifidobacterias que han adquirido adaptaciones genéticas específicas para el crecimiento selecto en glicanos de la leche crecen en presencia de HMOs⁴³. Por ejemplo, *B.infantis*, especie que se encuentra en gran número en el colon de infantes amamantados, posee un gen de 43 kb que codifica para sistemas de transporte y glicosil hidrolasas intracelulares, lo cual sugiere que los HMOs son internalizados y degradados⁴³. Por otro lado, *B.bifidum* empleado otro mecanismo catalítico para consumir HMOs al exportar sialidasas fucosidasas y lacto-N-biosidasa para liberar al lacto-N-biose de estructuras de HMOs; lacto-N-biose es luego transportada y metabolizada⁴³. Las glicosidasas extracelulares en algunas bacterias tal como *B.bifidum* pueden ser utilizadas como un mecanismo para liberar componentes de los HMOs, los cuales pueden ser fácilmente transportados por *B.longum* subtp. *infantis* u otras bacterias para su consumo⁴³. Por lo tanto, los HMOs además de prebióticos favorecen el crecimiento *Bifidobacterium* sobre otras especies bacterianas. Esta relación simbiótica de consumo de componentes de HMOs, puede ser uno de los mecanismos para la formación de la microbiota intestinal.

Las glicoproteínas de la leche materna también favorecen el crecimiento de bifidobacterias tanto en estudios in vitro e in vivo; al igual que algunos péptidos de la leche^{192, 193}. Sus efectos bifidogénico puede deberse a su porción glicana de estos glicoconjugados. La degradación de esta porción requiere de endo y exoglicosidasas y sistemas de transporte y de este modo permitir que los glicanos estén libres para ser empleados como fuente de energía^{43, 186}. Garrido y colaboradores¹⁹⁴ mostraron que algunas cepas de *Bifidobacterium* de infantes poseen un endo- β -N-acetilglucosaminidasa que interactuar con los N-glicanos y liberar los glicanos de las glicoproteínas. Además, cepas como *B.bifidum* tienen endo- β -acetilgalactosaminidasa que liberan a los glicanos de O-glicanos. Posteriormente los glicanos libres son catabolizados por vías endógenas de consumo de HMO particular para cada cepa de bifidobacterias^{43, 186}.

En el caso de los lactantes, los HMOs favorecen el establecimiento de cepas como *B.infantis* en el intestino ya que al estar favorecido su crecimiento por los HMOs, *B.infantis* incrementa su unión a células epiteliales intestinales, disminuye la liberación de citocinas inflamatorias e incrementa la liberación de citocinas antiinflamatorias en respuesta a un estímulo inflamatorio^{195, 196}. Lo que permite elucidar, que el crecimiento específico de ciertas bifidobacterias por parte de los HMOs promueve la persistencia *in situ* y modula positivamente el epitelio del hospedero⁴³. El crecimiento de bifidobacterias en el intestino infantil puede deberse a el resultado de una coevolución de las bacterias y los componentes de la leche materna como los HMOs^{197, 198}.

Las bifidobacterias, además modulan la respuesta inmune. Es conocido que *B.longum*, *B.breve*, *B.bifidum*, y *B.animalis* subsp *lactis*, en modelos *in vitro*, tienen la capacidad de inducir la maduración de CD y polarizar la respuesta de linfocitos T (Th1/Th2)¹⁸⁷. Estos estudios revelan que la producción de ciertas citocinas (como IL-10, TNF- α e IFN- γ) es dependiente de la cepa presente en el intestino (**Figura 5**) y con ello la respuesta de linfocitos T generada¹⁸⁷. Mediante la estimulación de células mononucleares de sangre periférica (**PBMCs** por sus siglas en inglés) con fracciones celulares de bifidobacterias, incluyendo fracciones citoplasmáticas, extractos de superficie y sobrenadantes se ha permitido la identificación de las determinantes moleculares que generan la respuesta inmune. Por ejemplo, una fracción citoplasmática de tripsina de *B.bifidum* fue identificada como factor de activación de linfocitos CD8+ y sobrenadantes de *B.breve* BB99 y *B.longum* 1941 inducen linfocitos Treg¹⁸⁷. Además, en modelos *in vitro* utilizando CD de infantes con enfermedad de Crohn's, se comprobó que *Bifidobacterium* mejoran la captación y procesamiento de antígeno de las células dendríticas de estos pacientes¹⁹⁹.

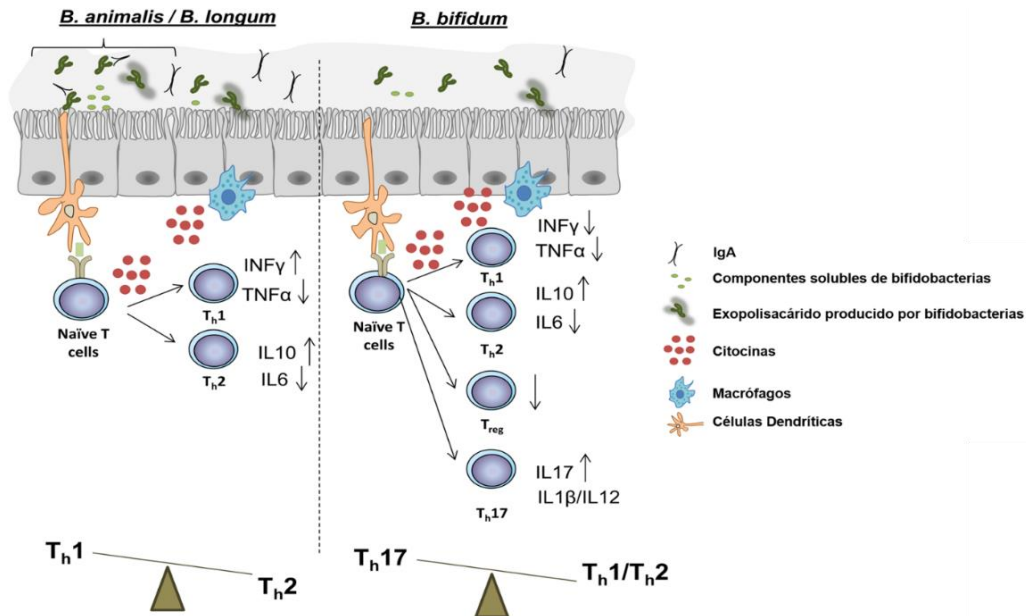


Figura 6. Representación esquemática de la respuesta inmune ocasionada por *Bifidobacterium* spp. Cepas como *B. animalis* y *B. longum* promueven respuestas del tipo Th1 mientras que cepas como *B. bifidum* inducen una polarización de respuesta Th17. Las propiedades inmunomoduladoras son dependientes de cepa. Abreviaturas: Th: Linfocitos T helper (cooperadores); IL: Interleucina. Modificado de Ruiz L. *Bifidobacteria and Their Molecular Communication with the Immune System*. 2017. 1-6

En otro modelo *in vitro* empleando esplenocitos^{200, 201}, líneas celulares de macrófagos^{202, 203, 204} o células aisladas del tejido linfoide asociado a intestino (GALT)²⁰⁵, el género *Bifidobacterium* también modula tanto el desarrollo como la respuestas proinflamatorias en el hospedero. En modelos *in vivo* de enfermedades intestinales por inflamación crónica de bajo grado se ha demostrado el potencial de *B. bifidum* y *B. animalis* para restaurar la barrera intestinal²⁰⁶. Siguiendo el mismo contexto, cepas como *B. longum* CECT 7347 atenúan la producción de citocinas inflamatorias y la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD4+ en modelo enteropatológico inducido por gliadina²⁰⁷. En modelos de alergia a antígenos alimentarios, una proteína derivada de vesícula de *B. longum* y *B. animalis* administradas durante el periodo de lactación, ejercen efectos inmunomoduladores^{208,209}. En modelos de intestino, *B. longum* cepa 51-A reduce la inflamación²¹⁰. Además, en modelos de obesidad, *B. pseudicatenuatum* restaura el balance linfocito-macrófago y *B. adolescentis* IM38 mejora la colitis inducida por dieta alta en grasas inhibiendo la activación de factor NF-κB inducido por lipopolisacárido^{211, 212}.

Relación Linfocitos Treg, Bacterias e IgA en intestino

El intestino alberga y está en constante contacto con una vasta diversidad de microorganismos, se estima que alrededor de 10^{14} bacterias habitan en el intestino. Disrupciones en la microbiota generan consecuencias patológicas. Muchos procesos están involucrados en el mantenimiento de la tolerancia a la microbiota dependientes de diferentes componentes reguladores. Una estrategia central utilizada por el hospedero para mantener la relación homeostática con la microbiota es el minimizar el contacto entre los microorganismos y la superficie de las células epiteliales y de este modo limitar la inflamación del tejido y translocación microbiana. Múltiples estrategias donde se involucran procesos tanto de la respuesta innata como adaptativa, tales como la secreción de moco, lisozimas, lactoferrina, defensinas e inducción de repuestas específicas mediante linfocitos T enfocadas en la producción de S-IgA, están presentes para preservar la homeostasis intestinal²¹³. Uno de los principales ejes que explica la tolerancia a la microbiota intestinal es el eje Linfocitos Treg-IgA-Bacterias.

A diferencia del sistema inmune sistémico, el sistema inmune del intestino no elimina a los microorganismos, si no que establece una relación simbiótica avanzada. Para ello se propone que los anticuerpos generados en respuesta a la colonización bacteriana del intestino forman la composición de la microbiota a través de un proceso denominado inmunoselección mediada por anticuerpos (**AMIS** por sus siglas en inglés) ya que los anticuerpos en el intestino van dirigidos contra microorganismos patogénicos para controlar las infecciones, pero además van dirigidos a microorganismos comensales. Esto sugiere que las inmunoglobulinas podrían influenciar en la composición de la microbiota favoreciendo la homeostasis intestinal. La inmunoselección se refiere a el proceso natural de selección dentro del organismo del hospedero que está mediado por el sistema inmune, en donde un repertorio de anticuerpos es resultado de un patrón dinámico de selección que conduce al establecimiento de comunidades únicas de microorganismos entre los individuos²¹⁴.

Estudios recientes han mostrado que cuando los microorganismos unidos y no unidos a IgA son comparados con el total de microorganismos presentes dentro de la mucosa o intestino, los microorganismos unidos a IgA son más similares a los microorganismos en mucosas que a los microorganismos fecales, sugiriendo que las IgA tienden a unirse a organismos que son más estrechamente asociados a los tejidos del hospedero^{214, 215}. Cabe señalar que, IgA se une preferentemente a organismos como bacterias filamentosas segmentadas, miembros flagelados pertenecientes a las Enterobacteriaceae y bacterias que degradan moco tal como *Akkermansia muciniphila*, todas ellas relacionadas con el tejido del huésped^{214, 216}.

Los linfocitos T tienen un rol central en la programación de la respuesta de anticuerpos contra bacterias comensales. Se ha visto que, en ratones que carecen de linfocitos T tienen significativamente reducida la diversidad microbiana en el intestino, comparada con los ratones control²¹⁷. Los linfocitos B pueden madurar a células productoras de anticuerpo con o sin la presencia de linfocitos T, a estas dos vías de diferenciación de linfocitos B se les conoce como respuesta dependiente de linfocitos T (**TD**) y respuesta independiente de linfocitos T (**TI**). Por lo general, la respuesta de IgA generada en las PP involucra la interacción de linfocitos T y linfocitos B2, lo cual resulta en la producción de IgA específica y de alta afinidad²¹⁸. En cambio, los linfocitos B1 son independientes de los linfocitos T generando anticuerpos IgA de polireactivos y de baja afinidad dentro de la lámina propia²¹⁴.

Los linfocitos T cooperadoras foliculares (**TFH**) son uno de los más importantes subtipos de linfocitos T involucradas en la inducción de IgA TD^{214, 219}. En estudios animales, en los cuales la molécula PD-1 no se expresa, tienen una gran abundancia de linfocitos TFH; Fargarasan y colaboradores exploraron como los linfocitos TFH influyen en la microbiota²²⁰. Ratones que eran deficientes de PD-1, presentaban niveles indetectables de *Bifidobacteria* spp y *Bacteriodes* spp y altos niveles de Enterobacteria comparada con los ratones control²¹⁴. La deficiencia de PD-1 conlleva a la pérdida de géneros bacterianos comensales y el desarrollo de

organismos patógenos. Aunque estos ratones tienen altos niveles de IgA libre en el intestino, las IgA se unen menos a bacterias presentes en el lumen²¹⁴. Los ratones deficientes de PD-1 tienen altos niveles de linfocitos TFH y mayor producción de linfocitos B secretores de IgA; lo cual sugiere que la alteración de la contribución de las respuestas de IgA TD y TI en el intestino tienen una importante consecuencia en la composición de la microbiota^{220, 221}

Por otra parte, es conocido que la ausencia de IgA o la falla en la selección de IgA en los centros germinales (CG) debido a un desregulado control por parte de los linfocitos T, quienes causan el balance de las comunidades microbianas intestinales, resulta en una activación elevada de todo el sistema inmune²²². La ausencia de linfocitos T FoxP3+ inducida por antígenos bacterianos modifica la composición de la microbiota neonatal intestinal provocando inflamación mediada por linfocitos Th2²²³. Cabe señalar que los linfocitos T FoxP3+ induce la generación de CG y linfocitos T en los CG y su disminución causa una rápida pérdida de respuesta IgA específica en el intestino^{224, 225}. La diferenciación de linfocitos T FoxP3+ en linfocitos Tfr (linfocitos Treg foliculares) es requerida para la selección de IgA's en los centros germinales. La calidad de IgA's influye directamente en la diversidad y estructura filogenética de las bacterias en el intestino; la abundante y equilibrada microbiota neonatal induce maduración del sistema inmune intestinal al promover linfocitos T FoxP3+ e IgA's. Por lo que, el sistema inmune adaptativo contribuye al mantenimiento, en vez de eliminar, de complejos de comunidades microbianas que probablemente enriquecen la capacidad genómica y metabólica del hospedero, el cual es requerido para la salud y homeostasis intestinal²¹⁷.

Kawamoto y colaboradores²¹⁷ demostraron que la calidad de la respuesta de IgA TD es importante para promover la diversidad microbiana. En un modelo murino, deficientes de linfocitos T, la transferencia de linfocitos T CD4+ naive disminuye aún más la diversidad microbiana. Sin embargo, la transferencia de linfocitos Treg a estos ratones restaura completamente la diversidad de la microbiota. Además, las IgA's producidas en ausencia de linfocitos Treg tienen un bajo índice de maduración de la afinidad, sugiriendo que la selección de afinidad en los folículos

está alterada aumentando la cantidad de bacterias que se unen a IgA. Por lo que, los linfocitos Treg promueven la producción de IgA's más específicas que van dirigidas a un rango muy reducido de bacterias.

Una vez que los microorganismos comensales se establecen en el intestino, estas cumplen funciones como descomponer los componentes dietéticos no digeribles o HMOs (como se expuso anteriormente). Uno de los metabolitos que es resultado de este proceso son los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), productos de fermentación²²⁶. Los SCFA, en particular el butirato, regulan a los linfocitos Treg al promover la proliferación y diferenciación de estas células en el intestino. El butirato es conocido por regular la expresión de genes epigenéticamente al inhibir las desacetilasas de histona (HDAC)²²⁷, esta función se atribuye a la generación de Treg en el intestino. Los productos metabólicos producidos por bacterias comensales pueden además actuar de manera directa o indirectamente en la función de las células inflamatorias. Por ejemplo, el reconocimiento de SCFA por células innatas es crucial para la regulación de la respuesta inflamatoria en respuesta no solamente a daño en el intestino sino además de modelos de artritis y alergia²²⁸.

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La alimentación del recién nacido con leche materna ha demostrado ser la mejor estrategia para disminuir la incidencia de enfermedades infecciosas como sepsis, neumonía, otitis media, diarrea y enterocolitis necrosante y no infecciosas como asma. De la leche materna, el calostro es la fuente más rica en anticuerpos, leucocitos, y probióticos, siendo la fuente de protección de mayor eficiencia al neonato tanto término como pretérmino, de los cuales los últimos son los más susceptibles al desarrollo de enfermedades antes mencionadas. Por ello, el estudio de los mecanismos que ayuden al entendimiento de los efectos protectores inducidos en la madre y que pueden ser transferidos son fuente de información que ayudará a reducir los gastos de inversión médica y complicaciones neonatales como estrategias profilácticas. Es por esto que el conocimiento acerca de los factores que coadyuvan a la transferencia de inmunidad y la mantienen en el neonato, como los linfocitos Treg, IgA's y la microbiota materna, ayudará en un futuro a implementar terapias adecuadas, incluso profilácticas, que coadyuven la respuesta inmunológica del neonato, permitiendo que los procesos inflamatorios, incluyendo los infecciosos, sean resueltos en menor tiempo, con menores secuelas y disminuyendo los días de estancia hospitalaria.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe alguna asociación entre los linfocitos Treg y la expresión de las moléculas asociadas con la inmunoregulación (CD152, CD279, TGF- β e IL-10) con la concentración de IgA's y la bacteria comensal *Bifidobacterium*?

HIPÓTESIS

La presencia de bacterias del género *Bifidobacterium* correlacionan con la presencia y fenotipo de linfocitos Treg y la concentración de anticuerpos de clase IgA en calostro humano.

OBJETIVO GENERAL

Establecer la relación que existe entre las bacterias del género *Bifidobacterium*, linfocitos Treg y la concentración de IgA en calostro humano.

Objetivos Particulares

1. Identificar y cuantificar el DNA bacteriano total y del género bacteriano *Bifidobacterium* en calostro humano.
2. Evaluar si los factores como la edad gestacional y la vía de nacimiento influyen en la presencia de *Bifidobacterium* en calostro humano.
3. Determinar la frecuencia y el fenotipo de los linfocitos Treg en calostro humano
4. Determinar la concentración de IgA's en calostro humano.
5. Determinar si existe una relación entre los linfocitos Treg, la concentración de IgA's y la bacteria comensal *Bifidobacterium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo del presente estudio fue evaluado, aprobado por el Comité de Investigación, Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) Isidro Espinosa de los Reyes (Registro: 3120-20706-01-16).

Diseño de estudio

Se realizó un estudio analítico, observacional, transversal y prospectivo.

Población de Estudio

Los experimentos se realizaron con dieciocho muestras de calostro recolectadas de voluntarias púerperas sanas del área de alojamiento del conjunto del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) “Isidro Espinosa de los Reyes” quienes accedieron a participar en el estudio y que dieron su consentimiento informado por escrito (**Anexo 1**).

Criterios de Exclusión

Mujeres que presentaban alguna de las siguientes características:

- Hijos con alteraciones genéticas o cromosómicas.
- Morbilidades como enfermedades autoinmunes, diabetes y/o hipertensión.
- Contraindicación para la Lactancia Materna.
- Antecedentes de tabaquismo, drogadicción o cualquier farmacodependencia.

Criterios de Eliminación

- Mujeres que retiraron su consentimiento informado.
- Muestras que no se haya podido extraer de DNA.

Recolección de muestra

- Colección de calostro

Posterior a la asepsia con jabón y agua, las pacientes aplicaron la técnica de Marmet para la extracción del calostro. Brevemente esta técnica consta de la presión manual sobre el pezón en movimientos rítmicos y repetitivos.

Se colectaron como mínimo 1.5 mL de calostro, del cual, 500 μ L se usó para la obtención del suero y células. Del volumen restante se realizaron alícuotas de 500 μ L y almacenaron a -20°C hasta su procesamiento para la identificación de bacterias.

Determinación de DNA bacteriano

➤ Extracción de DNA Total

Después de descongelar las alícuotas de calostro almacenadas, se utilizaron 100 μ L para aislar el DNA total, con el Mini Kit DNA QIAamp® (QIAGEN. Cat No:51306) en una campana de flujo laminar. Los extractos de DNA fueron tratados con 20 μ L de Proteínasa K (QIAGEN Protease) durante 1 minuto y 200 μ L de Buffer AL. Posteriormente la mezcla se transfirió a una columna con una membrana QIAamp de sílica. El DNA unido a la membrana, fue lavado con 500 μ L de dos diferentes Buffer (AW1 y AW2) mejorando la pureza del DNA eliminando los contaminantes. El DNA se eluyó con 200 μ L de Buffer AE (QIAGEN Protease), y se almacenó a -20°C .

➤ Identificación y Secuenciación de DNA bacteriano total y de *Bifidobacterium*

5 μ L del extracto de DNA total de cada muestra fueron adicionados a tubos de reacción que contenían 12.5 μ L de Taq PCR Master Mix 2X (QIAGEN, Cat 201443), 7.25 μ L de agua grado biología molecular (ATCC® 60-2450, Lot: 64460336) y 0.125 μ L de cada iniciador con una concentración de 50 μ M para un volumen final de 25 μ L. Los iniciadores fueron seleccionados de acuerdo a reportes previos y las secuencias se muestran en la **Tabla 3**. La PCR se llevó a cabo en un Termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf Scientific, USA), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial: 94°C , 3 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 40 s, alineamiento a 60°C durante 40 s y extensión a 72°C durante 40 s; y una extensión final de 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% a 70 V durante 60 min y se marcaron con GelRed® (Biotium™, Cat: 41003)

El patrón de corrimiento electroforético se documentó mediante el equipo de bioimagen Alphamager HP (*Cell Biosciences*) utilizando iluminación ultravioleta.

Los amplificadores esperados para bacterias (1500 pb) y el género *Bifidobacterium* (228-245 pb) fueron purificados del gel de agarosa utilizando el kit Recovery DNA Gel (*Zymoclen*™, Cat: D4001T). Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados por el método de Sanger en la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/servicios>). Las secuencias de nucleótidos se compararon con las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Tabla 3. Secuencias y características de los iniciadores utilizados

| Bacteria | Nombre | Secuencia (5'----3') | Temperatura de alineamiento | Tamaño del amplificado | Referencia |
|---------------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|---------------|
| <i>Universal (16S rRNA)</i> | p1b16 (Sentido) | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | 60°C | 228-245 pb | 229 |
| | m1b16 (Antisentido) | GGCTGCTGGCACGTAGTTAG | | | 229 |
| <i>Bifidobacterium spp (16S rRNA)</i> | Im26 (Sentido) | GATTCTGGCTCAGGATGAACGC | 60°C | 500 pb | 230, 231, 232 |
| | Bif228 (Antisentido) | CTGATAGGACGCGACCCCAT | | | 230, 231, 232 |

➤ **Cuantificación de copias de DNA bacteriano total y del género *Bifidobacterium* por PCR en tiempo real**

Con el objetivo de hacer más sensible el método de cuantificación de copias de DNA, las muestras fueron concentradas y preamplificadas. Para ello, 80 µL del extracto de DNA total de calostro se mezcló con 40 µL de acetato de amonio 7.5 M, 80 µL de etanol grado biología molecular y 6.4 µL de glucógeno (20 ng/µL) y se incubaron a -70°C durante 30 min. El DNA se concentró por centrifugación (15300g a 4°C por 15 min) y el sobrenadante fue desechado. Entonces, el botón de DNA precipitado se lavó con 300 µL de etanol frío (70%) y el DNA nuevamente fue centrifugado (10600g a 4°C por 5 min) y lavado con etanol frío (70%). Posteriormente se realizó una última centrifugación (10600g a 4°C por 5 min) y el sobrenadante se desechó y el exceso de etanol se eliminó por secado durante 30

min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de secado el DNA se resuspendió el DNA en 30 μL de agua grado biología molecular (ATCC® 60-2450, Lot: 64460336).

Del DNA concentrado, se hizo una dilución 1:10 para cuantificar en el espectrofotómetro UV-Visible, NanoDrop™ (*Thermo Scientific*).

Una vez concentrado el DNA total, 5 μL de cada muestra fueron preamplificados mediante PCR punto final durante 20 ciclos con la estrategia anteriormente descrita. Posteriormente, 2 μL de los productos de preamplificación se mezclaron con 5 μL de SYBR Green PCR Master Mix (*QIAGEN*, Cat.No: 204074), 0.125 μL de cada uno de los iniciadores (50 μM) en un volumen final de reacción de 10 μL . En conjunto con el tratamiento de cada muestra de calostro, se incluyó una curva de referencia de 4 puntos con concentraciones conocidas de DNA de cepas de referencia (DNA de *Bifidobacterium longum subsp. Infantis* cepa S12 (ATCC®-15697D-5™). Para el caso del DNA Bacteriano total, se realizó una curva con concentraciones de 30 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 3 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 0.3 $\text{pg}/\mu\text{L}$ y 0.030 $\text{pg}/\mu\text{L}$, mientras que para la cuantificación de DNA de *Bifidobacterium* se emplearon concentraciones de 15 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 1.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 0.15 $\text{pg}/\mu\text{L}$ y 0.015 $\text{pg}/\mu\text{L}$. La amplificación se realizó un equipo Rotor-Gen® Q (*QIAGEN*, No,de serie: 0912101) usando un rotor de 100 pozos. El protocolo térmico aplicado constó de 3 pasos; activación de la enzima (95°C por 10 min) DNA polimerasa HotStarTaq Plus (*QIAGEN*), amplificación (desnaturalización: 95°C por 20 s, alineamiento: 60°C por 15 s y extensión: 72°C por 20 s durante 40 ciclos), y curva de fusión o *melting curve* (72°C a 95°C, en incrementos graduales de temperatura, 1°C por cada 5 s). La fluorescencia de los productos se detectó en el último paso de cada ciclo (paso de extensión).

La concentración de DNA Bacteriano y DNA del género *Bifidobacterium* en cada muestra se calculó a través de la interpolación de los valores de Ct (ciclo umbral) obtenidos para cada muestra en la curva estándar. Cada determinación de concentración de DNA Bacteriano y DNA del género *Bifidobacterium* en las muestras se realizó por triplicado. El análisis de los resultados se llevó a cabo con el Software Rotor-Gen Q-Pure Detection (versión 2.1.0.9)

Obtención suero y de células de calostro

Se realizó un primer lavado a las muestras diluyendo 1 volumen de calostro en cada 3 volúmenes de solución isotónica amortiguadora (BD, FACSTFlow Cat. No.342003) y se centrifugó a 600g durante 15 minutos. El contenido graso se eliminó manualmente con una gasa y del sobrenadante se recolectó alícuotas de 500µL, mismas que se almacenaron a -20°C para la posterior cuantificación de IgA's. El resto del suero fue eliminado por decantación. Después de resuspender el botón celular con el volumen restante, se realizó un segundo lavado con el mismo volumen de FACSTFlow inicial y se centrifugó a 400g durante 5 minutos; el sobrenadante se retiró y el botón celular se resuspendió en 200 µL de solución amortiguadora. Una vez que las células estaban en suspensión, la densidad de células vivas totales se obtuvo separando 2 µL de la suspensión celular y diluyéndola con 18 µL azul de Tripano (1:10), y posterior uso del contador de células automatizado Countess® (Invitrogen). La suspensión celular se ajustó a 5×10^5 células vivas/mL para realizar el inmunomarcaje e identificar a los linfocitos Treg.

Identificación de Linfocitos Treg

Partiendo de 5×10^5 células vivas de calostro de cada voluntaria se realizó el inmunomarcaje acorde a los siguientes procedimientos.

➤ Inmunomarcaje de Superficie

La suspensión celular se puso en contacto con anticuerpos monoclonales previamente titulados (**Tabla 4**) y posteriormente se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Los marcadores que se incluyeron fueron: CD45, CD3, CD4, CD25, CD45RO, CD45RA, CD152, CD279 y FVD (Fixable Viability Dye). Transcurrido el tiempo de incubación, se fijaron las células con una solución de Paraformaldehído (<15%), dietilenglicol (<50%) y Cloruro de Amonio (diluido 1:10, BD, FACST™ Lysing Solution, Cat.No. 349202). Inmediatamente las células se incubaron 10 minutos en obscuridad a 4°C y el exceso de anticuerpo se retiró por centrifugación a 400g durante 5 minutos. Las células se almacenaron a 4°C para su posterior

análisis en un citómetro de flujo FACS Aria III (BD) equipado con láseres de 405, 488 y 603 nm.

➤ **Inmunomarcaje Intracelular**

Primero se realizó un inmunomarcaje de superficie a la suspensión celular utilizando anticuerpos anti: CD45, CD3, CD4, CD25, CD45RO, CD45RA y CD127 previamente titulados (**Tabla 5**). Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, se adicionó una solución permeabilizadora (BD Cytotfix/Cytoperm™, Cat: 51-2090KZ) y se incubaron a 4°C durante 20 minutos. Las células se lavaron con una solución amortiguadora (diluida 1:10; BD, Perm Wash Buffer™ Cat.No. 421002), se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en el volumen restante. Enseguida se adicionó el anticuerpo intracelular anti-TGF-β e IL-10 (**Tabla 5**) y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado adicional con Perm Wash Buffer™ (diluido 1:10) para retirar el exceso de anticuerpo. Las células se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su análisis por citometría de flujo.

Tabla 4. Anticuerpos monoclonales utilizados para el inmunomarcaje de superficie

| Marcador | Fluorocromo | Marca | Clona | Lote | Catálogo | Volumen titulado (μL) |
|---------------|---------------|----------------|--------|-------------|------------|-----------------------|
| CD45 | eFluor450 | eBioscience | HI30 | E10921-1637 | 48-0459-42 | 0.3 |
| CD3 | PerCP | BD Biosciences | SE | 4232779 | 347344 | 5 |
| CD4 | APC-eFluor780 | eBioscience | OKT4 | E16572-105 | 47-0048-42 | 0.5 |
| CD25 | PE-Cy7 | BD Biosciences | M-A251 | 7180556 | 557741 | 0.3 |
| CD45RO | FITC | BD Biosciences | SE | 6301647 | 555492 | 2.5 |
| CD45RA | PE-CF594 | BD Biosciences | HI100 | 7053884 | 562298 | 0.3 |
| CD152 | APC | BioLegend | L3D10 | B185662 | 349908 | 2.5 |
| CD279 | PE | BD Biosciences | EH12.1 | 7096851 | 560795 | 1 |
| FVD | PE | eBioscience | SE | E15162-127 | 65-0866-14 | 0.25 |

Tabla 5 Anticuerpos monoclonales utilizados para el inmunomarcaje intracelular.

| Marcador | Fluorocromo | Marca | Clona | Lote | Catálogo | Volumen titulado (µL) |
|----------|---------------|----------------|----------|------------|------------|-----------------------|
| CD45 | BV510 | BD Biosciences | HI30 | 7137526 | 563204 | 2 |
| CD3 | PerCP | BD Biosciences | SE | 4232779 | 347344 | 5 |
| CD4 | APC-eFluor780 | eBioscience | OKT4 | E16572-105 | 47-0048-42 | 0.5 |
| CD25 | PE-Cy7 | BD Biosciences | M-A251 | 7180556 | 557741 | 0.3 |
| CD45RO | FITC | BD Biosciences | SE | 6301647 | 555492 | 2.5 |
| CD45RA | PE-CF594 | BD Biosciences | HI100 | 7053884 | 562298 | 0.3 |
| CD127 | APC | eBioscience | eBioRDR5 | 4272503 | 17-127842 | 0.5 |
| TGF-β | PE | MACS | SE | 5141127093 | SE | 2.5 |
| IL-10 | BV421 | BD Biosciences | JES3-9D7 | 6354639 | 564053 | 1.5 |

➤ **Algoritmo de análisis para la identificación y caracterización de Treg en calostro**

El algoritmo de análisis para la identificación y caracterización de Linfocitos Treg en calostro humano se estableció tomando como referencia lo reportado por Cébulo y colaboradores¹³¹; el cual consiste en seleccionar los eventos sencillos con el diagrama FSC-A vs FSC-H para descartar los eventos agregados (**Figura 7a**), a partir de los eventos sencillos; nos centramos en la identificación de los leucocitos, que son aquellos que expresan en gran proporción CD45 y tienen baja complejidad (CD45 vs SSC-A). Posteriormente, con el marcador CD3 seleccionamos los linfocitos T y con el marcador de viabilidad FVD nos aseguramos de solo analizar linfocitos T vivos (CD3 vs FVD). Mediante la alta expresión del marcador CD4 identificamos a los Linfocitos T cooperadores; a partir de estos, las células que presentan alta expresión de CD25 corresponden a linfocitos T reguladores (CD4 vs CD25). Finalmente, evaluamos la experiencia antigénica de estos linfocitos mediante la molécula CD45RO que se asocia a la memoria inmunológica (CD45+); donde la mayoría de los linfocitos T reguladores en calostro tienen fenotipo de memoria (CD45RO vs SSC-A). **Figura 7b**

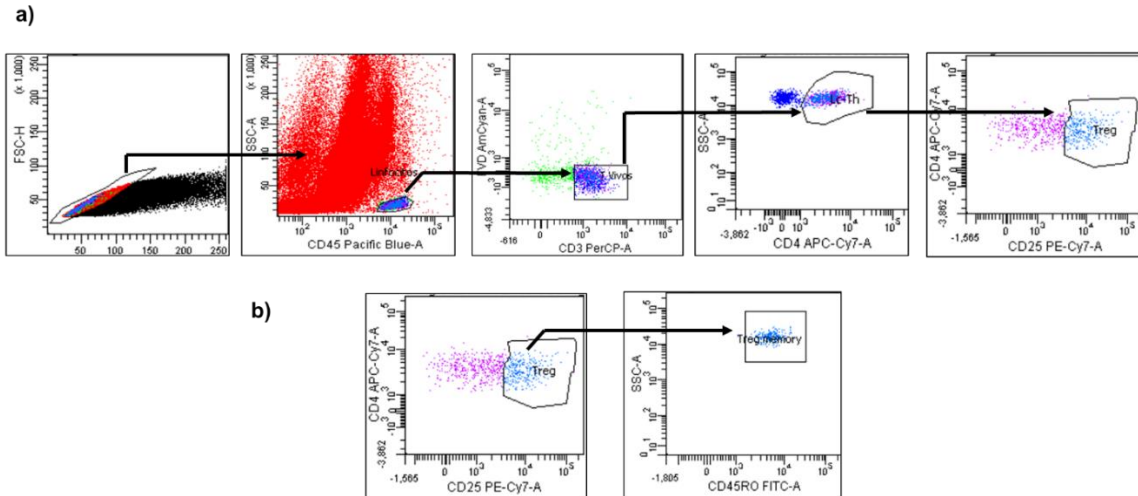


Figura 7. Algoritmo de análisis para la identificación y caracterización de Linfocitos T reguladores en Calostro. A partir de los eventos sencillos (FSC-A vs FSC-H) se seleccionó la región de linfocitos (CD45⁺ vs SSC-A^{low}) y posteriormente los linfocitos T viables (CD3⁺ vs FVD-). De estos linfocitos T, se seleccionaron aquellos pertenecientes a la población de T cooperadores (CD4⁺ vs SSC-A^{high}). De estos últimos, se eligieron los correspondientes a la subpoblación con fenotipo regulador (Treg, CD25^{high}) (a). Los linfocitos Treg presentes en calostro tienen en su mayoría fenotipo de memoria (CD45RO⁺) (b). Diagramas de puntos de una muestra representativa evaluada por citometría de flujo.

También para la caracterización de Treg, evaluamos la expresión relativa de moléculas con funciones inmunoregulatoras: CD279, CD152, TGF- β e IL-10. A partir de los diagramas de puntos e histogramas identificamos los linfocitos Treg y su expresión de moléculas inmunoregulatoras en calostro **Figura 8**.

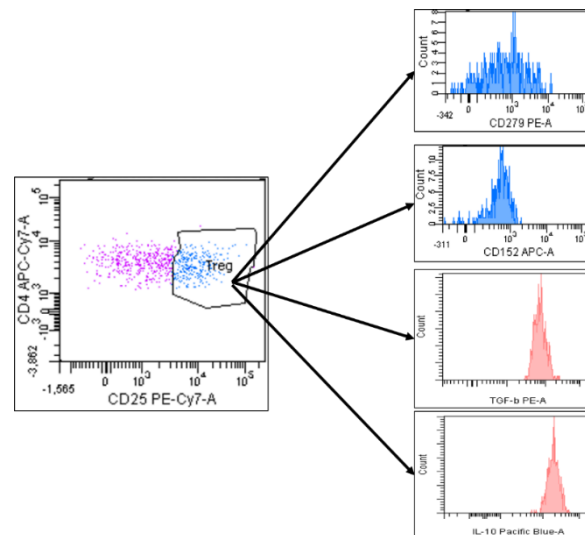


Figura 8. Expresión de moléculas inmunoregulatoras en calostro. La identificación y cuantificación de las moléculas CD279, CD152, TGF- β e IL-10 se realizó mediante la expresión relativa (medida con la intensidad media de fluorescencia, IMF). Diagrama de puntos e histograma de muestra representativa evaluada por citometría de flujo.

Cuantificación de la concentración de IgAs en calostro

Para la determinación de las concentraciones de IgAs solubles en suero de calostro se realizaron inmunoensayos utilizando el kit IgA Flex Set (BD Biosciences, Cat 558681) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 50 μ L del suero de calostro son incubados con perlas con anticuerpos acoplados de captura durante 1.5 horas y posterior adición de anticuerpos reporteros conjugados con el fluorocromo ficoeritrina (PE). Después de lavados, las muestras se analizaron por citometría de flujo, donde la concentración de IgAs de las muestras es directamente proporcional a la señal reportera. A la par del procesamiento de las muestras se realizó una curva de referencia de 10 puntos (concentración mayor 2,730 ng/mL) con factor de dilución 1/2 para obtener la concentración de cada muestra utilizando el software LEGENDplex™ Data Analysis (Biolegend).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism versión 7.00. Se utilizaron pruebas ANOVA de una vía para la comparación de los tres grupos establecidos y pruebas de correlación de Pearson para determinar asociaciones entre los parámetros evaluados.

RESULTADOS

Características de la Población

En el presente estudio se incluyeron 18 mujeres puérperas. Las características de las voluntarias y de los recién nacidos se resumen en la **Tabla 6**. Las mujeres participantes se encuentran en la edad reproductiva de menor riesgo teniendo entre 1 y 3 gestas previas. En los recién nacidos, la mayoría de los niños llegaron a término (55%), mientras que el resto llegaron a término tardío (45%), siendo mayor número de casos de nacimiento por cesárea (78%) y los menos por parto eutócico (22%). De éstos, el género de los bebés estaba repartido equitativamente.

Tabla 6. Datos demográficos del universo de estudio.

| Madre (n=18) | |
|-----------------------------|---|
| Edad (años) | 27.5 ± 6.7 |
| Gestas | 2.4 ± 1.2 |
| Recién Nacido (n=18) | |
| Semanas de Gestación (SDG) | 37.4 ± 1.4 Pretérmino: 8 Término: 10 |
| Vía de Nacimiento | Vaginal: 4; Cesárea: 14 |
| Peso (kg) | 2.7 ± 4.9 |
| Talla (cm) | 48.0 ± 2.4 |
| Género | Masculino: 9; Femenino: 9 |

Se muestra el promedio ±SD (desviación estándar). **IMC:** Índice de Masa Corporal. **SDG:** Semanas de Gestación

Dentro de la heterogeneidad de la población factores como la edad gestacional y la vía de nacimiento afectan la composición del calostro. Por lo que, dividimos nuestro universo estudio en grupos pre-termino (<37 SDG) vs término (≥ 37 SDG), y vía de nacimiento, cesárea vs vaginal, mismos que son comparables entre sí (**Tabla 7** y **Tabla 8**).

Tabla 7. Agrupación de la población de estudio con relación a la edad gestacional.

| Madre | Pretérmino (n=8) | Término (n=10) | P |
|---------------------------|------------------|----------------|---------|
| Edad (años) | 26.3 ± 6.7 | 28.1 ± 6.7 | >0.05 |
| Semana de Gestación (SDG) | 36.0 ± 0.6 | 38.5 ± 0.9 | <0.0001 |
| IMC (Kg/m ²) | 25.1 ± 5.7 | 23.6 ± 6.9 | >0.05 |
| Gestas | 2.5 ± 1.4 | 2.4 ± 0.9 | >0.05 |

Se muestra el promedio ±SD (desviación estándar). **IMC:** Índice de Masa Corporal. **SDG:** Semanas de Gestación. Prueba de Mann Whitney

Tabla 8. Agrupación de la población de estudio con relación a la vía de nacimiento

| Madre | Cesárea (n=14) | Vaginal (n=4) | P |
|---------------------------|----------------|---------------|-------|
| Edad (años) | 28.6+/- 6.7 | 22.5 +/- 4.5 | >0.05 |
| Semana de Gestación (SDG) | 37.1 +/- 1.4 | 38.0+/- 1.6 | >0.05 |
| IMC (Kg/m ²) | 25.1 +/- 7.0 | 21.3 +/- 2.6 | >0.05 |
| Gestas | 2.6 +/- 1.2 | 2.0 +/- 0.7 | >0.05 |

Se muestra el promedio ±SD (desviación estándar). **IMC:** Índice de Masa Corporal. **SDG:** Semanas de Gestación. Prueba de Mann Whitney

Estandarización de la detección y cuantificación de bacterias en calostro

Después de la reacción de PCR con las condiciones “punto final”, se realizó el corrimiento electroforético de los productos de amplificación. Como se puede ver en las muestras representativas de la **Figura 9**, los iniciadores designados para la amplificación del gen perteneciente al rRNA 16S de *Bifidobacterium* generan secuencias de 228-245 pb mientras que los iniciadores del gen perteneciente al rRNA 16S bacteriano generan secuencias de aproximadamente 500 pb. El análisis de las secuencias mostró que los productos de los iniciadores para *Bifidobacterium* spp tienen el 100 % de identidad con las secuencias que codifican para el gen 16S rRNA de bacterias del género *Bifidobacterium*, mientras que los productos de los iniciadores Universales muestran altos porcentajes de identidad con secuencias de géneros de bacterias de diferentes géneros como *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* o *Lactobacillus* (**Tabla 9** y **Tabla S1**). Además, observamos que el alineamiento de las secuencias con alto grado de identidad es similar para los iniciadores Sentido y Antisentido.

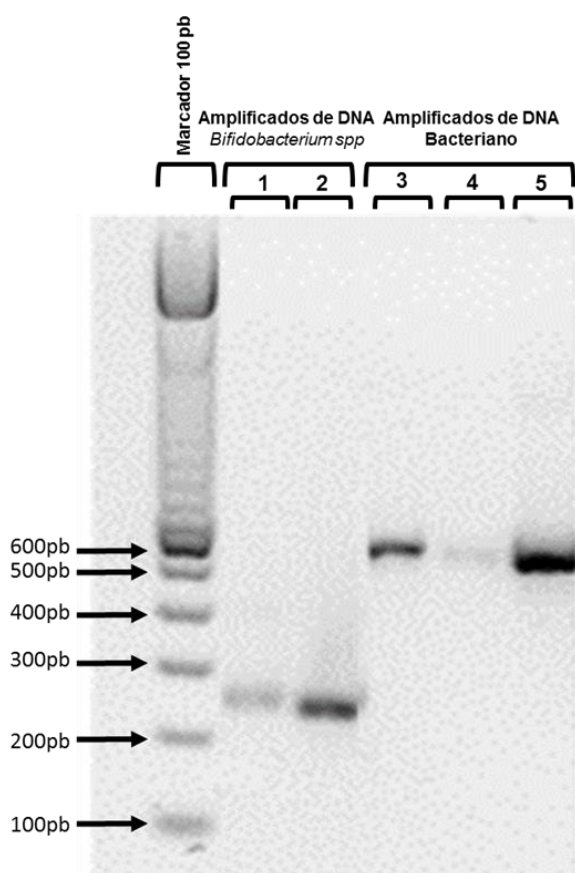


Figura 9. Amplificados obtenidos a partir de los iniciadores para bacterias (Universales) y el género *Bifidobacterium*. Las bandas de los carriles 1 y 2 (aproximadamente 245 pb) corresponden a los amplificados por los iniciadores de *Bifidobacterium*. Las bandas de los carriles 3, 4 y 5 (aproximadamente 500 pb) pertenecen a las amplificados de los iniciadores Universales.

Tabla 9. Secuencias representativas del análisis BLAST

| Amplificado (pb) | Iniciador (Sentido/Antisentido) | Descripción | % de Identidad | Clave de Acceso Gen Bank |
|------------------|---------------------------------|---|----------------|----------------------------|
| 228-245 | Sentido | <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> gen para rRNA 16S secuencia parcial, cepa YIT 4019 | 100 | AB924514.1 |
| | | <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697=JCM 1222=DMS 20088, gen de RNA ribosomal 16S, secuencia parcial | 100 | KP32372.1 |
| | | <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> , gen de RNA ribosomal 16S secuencia parcial | 100 | KM577186.1 |
| | Antisentido | <i>Bifidobacterium longum</i> gen para rRNA 16S secuencia parcial, cepa:JCM1210 | 100 | AB507100.1 |
| | | <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> gen para rRNA 16S, secuencia parcial, cepa: JCM 1222 | 100 | LC071820.1 |
| | | <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> gen para rRNA, secuencia parcial, cepa: YIT 12734 | 100 | AB924519.1 |

| | | | | |
|-----|-------------|--|----|----------------------------|
| 500 | Sentido | <i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa HCD29-3 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | MH11607.1 |
| | | <i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa HCD26-3 gen para rRNA 16S secuencia parcial | 99 | MH111592.1 |
| | | <i>Staphylococcus sp.</i> cepa InS-282 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | KY964236.1 |
| | Antisentido | <i>Staphylococcus sp.</i> RKVR_SS1 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | JX317679.1 |
| | | <i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa RKHC-78A gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | JQ282825.1 |
| | | <i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa iCTE621 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | DQ122332.1 |

rRNA: RNA ribosomal

Una vez comprobado que los iniciadores amplifican secuencias de bacterias totales, y de manera específica las correspondientes al género *Bifidobacterium*, la concentración de DNA bacteriana se obtuvo por PCR en tiempo real. Como se observa en la **Figura 10**.

El ciclo umbral (Cu), como parámetro reportero, muestra un comportamiento inversamente proporcional a la concentración de las muestras. Así mismo, el grado de asociación lineal entre Cu y el log10 de la concentración de las muestras de referencia mostraron una fuerte correlación para las determinaciones de bacterias totales y *Bifidobacterium* ($r=0.998$ y 0.997 respectivamente). Además, ambas reacciones tuvieron alto coeficiente de determinación ($r^2=0.995$ y 0.997 respectivamente) y eficiencias del 100%. Por otro lado, la determinación de la concentración de DNA en las muestras se comporta de manera lineal respecto a la ecuación de la curva de referencia correspondiente (puntos azules en las gráficas).

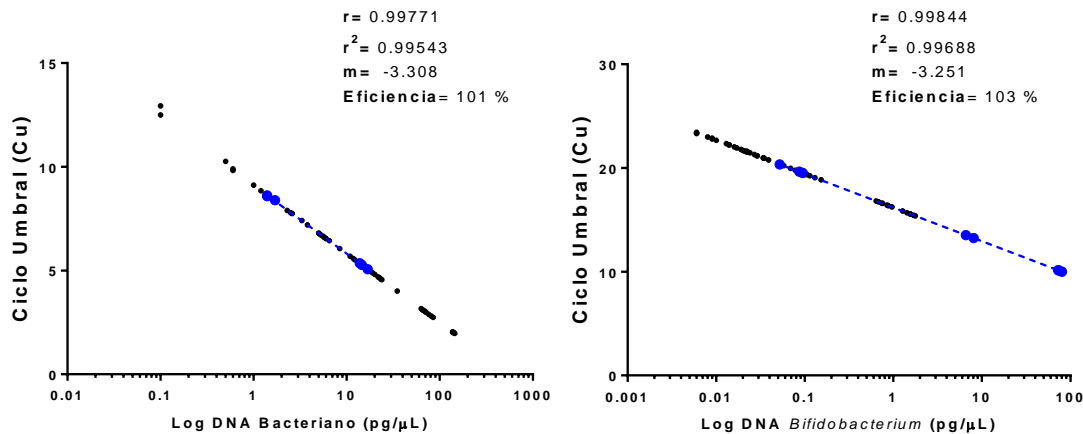


Figura 10. Curvas de cuantificación de DNA mediante PCR tiempo real. Concentración de DNA Bacteriano (a) y del género *Bifidobacterium* (b) vs Ciclo Umbral (Cu). La eficiencia fue calculada con la ecuación $E=10^{(-1/m)-1} \cdot 100$

El porcentaje de DNA el género *Bifidobacterium* en calostro es mayor en los nacimientos pretérmino, pero no afecta las características de Treg e IgAs.

Siendo el tiempo de gestación un factor que afecta la composición de la leche materna, los grupos se dividieron en pretérmino y término. Como observamos en la **Figura 11**, el tiempo de gestación no afecta la concentración de DNA Bacteriano (**Figura 11 a**), ni la concentración de DNA de *Bifidobacterium* (**Figura 11 a**). Sin embargo, el porcentaje de DNA de *Bifidobacterium*, es mayor en calostro de mujeres puérperas que tuvieron un parto pretérmino que aquellas que llegaron a término ($2.9 \pm 2.0\%$ vs $1.8 \pm 4.4\%$; $p=0.006$) (**Figura 11 c**).

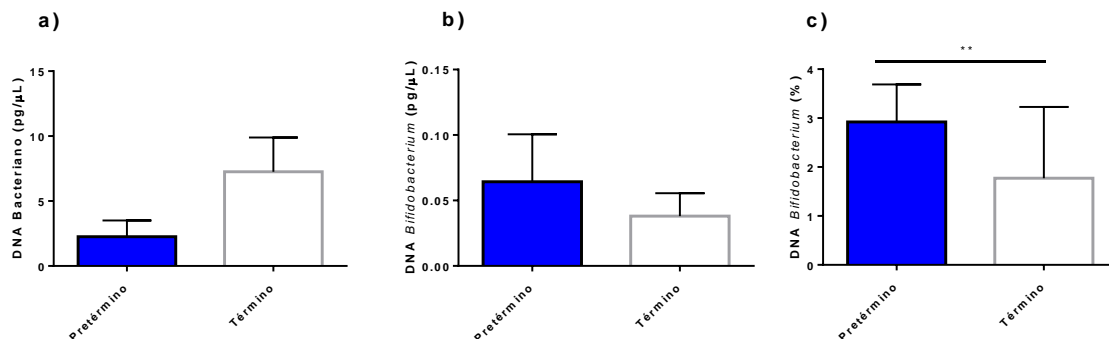


Figura 11. El porcentaje de DNA el género *Bifidobacterium* en Calostro es mayor en los nacimientos pretérmino. Las gráficas representan, la concentración de DNA Bacteriano (a), concentración de DNA de *Bifidobacterium* (b) y el porcentaje de DNA de *Bifidobacterium* (c) en muestras de calostro de mujeres puérperas que su embarazo fue pretérmino (barras azules) o término (barras blancas). La concentración de DNA fue determinada por PCR en tiempo real. Prueba de Mann Whitney. $**p<0.01$.

De la misma manera, considerando el tiempo de gestación observamos que el número de Treg, sus frecuencias y expresión de las moléculas CD279, CD152, TGF- β , e IL-10, así como la concentración de IgA en calostro, son similares en grupos pretérmino y término (**Tabla 10**).

Tabla 10. Comparación de las características de Treg e IgAs en Calostro de acuerdo al tiempo de gestación.

| Parámetro Medido | Pretérmino | Término | P |
|----------------------------------|---------------------|----------------------|-------|
| Treg (células/mL) | 1831.1 \pm 1921.6 | 7614.7 \pm 13982.0 | >0.05 |
| Treg (%) | 28.6 \pm 11.3 | 28.5 \pm 12.1 | >0.05 |
| Expresión CD279 (IMF)* | 2519.6 \pm 1665.8 | 2019.0 \pm 1343.0 | >0.05 |
| Expresión CD152 (IMF)* | 1052.4 \pm 1602.7 | 653.1 \pm 477.0 | >0.05 |
| Expresión de TGF- β (IMF)* | 2918.7 \pm 1707.2 | 5029.1 \pm 5551.6 | >0.05 |
| Expresión IL-10 (IMF)* | 1421.4 \pm 1880.7 | 3054.4 \pm 4398.3 | >0.05 |
| IgA (ng/mL) | 1098.0 \pm 221.9 | 1132.3 \pm 806.2 | >0.05 |

Se muestra el promedio \pm SD (desviación estándar). **MFI:** Intensidad Media de Fluorescencia. Prueba de Mann Whitney. * Expresión de las moléculas en Treg.

La vía de nacimiento no afecta la composición de bacterias, Treg e IgA de calostro humano

Como otro factor que modifica la composición de la leche materna, también se evaluó si la vía de nacimiento (cesárea vs vaginal) impacta en la composición de bacterias, Treg e IgA de calostro humano. Como se puede ver en la **Figura 12**, la concentración de DNA Bacteriano, la concentración de DNA de *Bifidobacterium* y el porcentaje de DNA de *Bifidobacterium*, son similares entre ambas vías de nacimiento. Por otro lado, el número, porcentaje y características de Treg, así como la concentración de IgAs, también son similares entre los grupos (**Tabla 11**).

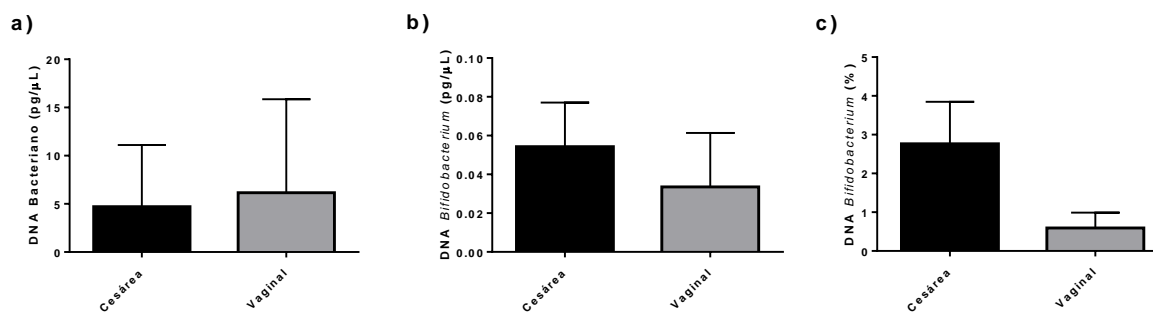


Figura 12. El DNA bacteriano total y el DNA de *Bifidobacterium* no es afectado por la vía de nacimiento. Las gráficas representan la concentración de DNA Bacteriano (a), concentración de DNA de *Bifidobacterium* (b) y el porcentaje de DNA de *Bifidobacterium* (c) en muestras de calostro de mujeres puérperas que su embarazo se resolvió por parto cesárea (barras negras) o vaginal (barras grises). La concentración de DNA fue determinada por PCR en tiempo real. Prueba de Mann Whitney.

Tabla 11. Comparación de las características de Treg e IgAs en Calostro de acuerdo a la vía de nacimiento.

| Parámetro Medido | Cesárea | Vaginal | P |
|---------------------------|------------------|-----------------|-------|
| Treg (células/mL) | 6049.8 ± 12319.3 | 2188.1 ± 3574.1 | >0.05 |
| Treg (%) | 28.1 ± 12.4 | 30.1 ± 8.8 | >0.05 |
| Expresión CD279 (IMF)* | 2051.8 ± 1129.1 | 2922.0 ± 2239.4 | >0.05 |
| Expresión CD152 (IMF)* | 597.4 ± 463.5 | 1618.8 ± 2079.7 | >0.05 |
| Expresión de TGF-β (IMF)* | 3905.9 ± 4658.0 | 4424.8 ± 3321.4 | >0.05 |
| Expresión IL-10 (IMF)* | 1780.3 ± 2860.2 | 3998.8 ± 4921.0 | >0.05 |
| IgA (ng/mL) | 1096.8 ± 612.8 | 1224.1 ± 712.9 | >0.05 |

Se muestra el promedio ± SD (desviación estándar). **MF:** Intensidad Media de Fluorescencia. Prueba de Mann Whitney. * Expresión de las moléculas en Treg.

La presencia de Treg está inversamente relacionada con la concentración de IgAs, pero directamente con el predominio de Bifidobacterias

Una vez identificados y caracterizados los linfocitos Treg, la concentración de IgA's y la cuantificación de bacterias del género bacteriano *Bifidobacterium* se buscó la asociación biparamétrica que existen entre ellas. Como se muestra en la **Tabla 12** no encontramos una relación significativa entre la concentración de los anticuerpos IgA's con la presencia de *Bifidobacterium* ni con la concentración de bacterias totales. Además, observamos que esta inmunoglobulina no se asocia a las moléculas inmunoregulatoras como CD279, CD152 y TGF β de Treg, sin embargo, sí existe una asociación negativa entre el número de Treg y la expresión de IL-10 (**Figura 13 a y b**).

Por otro lado, la expresión de TGF β e IL-10, ambas en Treg, están asociadas de forma positiva entre sí (**Figura 13 c**), y de manera interesante la expresión de IL-10 se relaciona con la concentración de bacterias totales (**Figura 13 d**), mientras que los incrementos en el número total de Treg se asocian con mayor proporción de bifidobacterias entre las bacterias totales (**Figura 13 e**). Sin embargo, el porcentaje de Treg tiene relación inversa con presencia de bacterias totales y bifidobacterias (**Figura 13 f y g**). Interesantemente, el incremento de bifidobacterias correlaciona con el incremento de bacterias totales (**Figura 13 h**).

Tabla 12. Relación IgAs-Treg-Bifidobacterias.

| Parámetro | IgA (ng/mL) | Treg (cel/mL) | Treg (%) | CD279 (IMF) | CD152 (IMF) | TGF- β (IMF) | IL-10 (IMF) | Bacterias (pg/ μ L) | <i>Bifidobacterium</i> (pg/ μ L) | <i>Bifidobacterium</i> (%) |
|--------------------------------------|-------------|---------------------|----------|-------------------|-------------|--------------------|--------------------|-------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| IgA (ng/mL) | | -0.94 *** | -0.18 | 0.42 | 0.08 | -0.23 | -0.65 * | -0.10 | -0.29 | -0.22 |
| Treg (cel/mL) | | | 0.36 | -0.41 | 0.06 | -0.29 | -0.09 | -0.22 | -0.08 | 0.62 * |
| Treg (%) | | | | -0.55 * | -0.05 | -0.16 | -0.27 | -0.62 ** | -0.54 * | 0.10 |
| CD279 (IMF) | | | | | 0.34 | -0.10 | 0.25 | 0.36 | 0.43 | 0.01 |
| CD152 (IMF) | | | | | | 0.50 | -0.20 | -0.07 | -0.10 | -0.10 |
| TGF- β (IMF) | | | | | | | 0.75 *** | 0.43 | -0.42 | 0.10 |
| IL-10 (IMF) | | | | | | | | 0.51 * | 0.36 | -0.11 |
| Bacterias (pg/ μ L) | | | | | | | | | 0.57 * | -0.39 |
| <i>Bifidobacterium</i> (pg/ μ L) | | | | | | | | | | 0.51 * |
| <i>Bifidobacterium</i> (%) | | | | | | | | | | |

La matriz representa las pruebas de correlación biparamétricas de Spearman entre cada uno de las mediciones. Como valor numérico se representa el coeficiente de correlación (r). *P<0.05; **P<0.01. ***P<0.001.

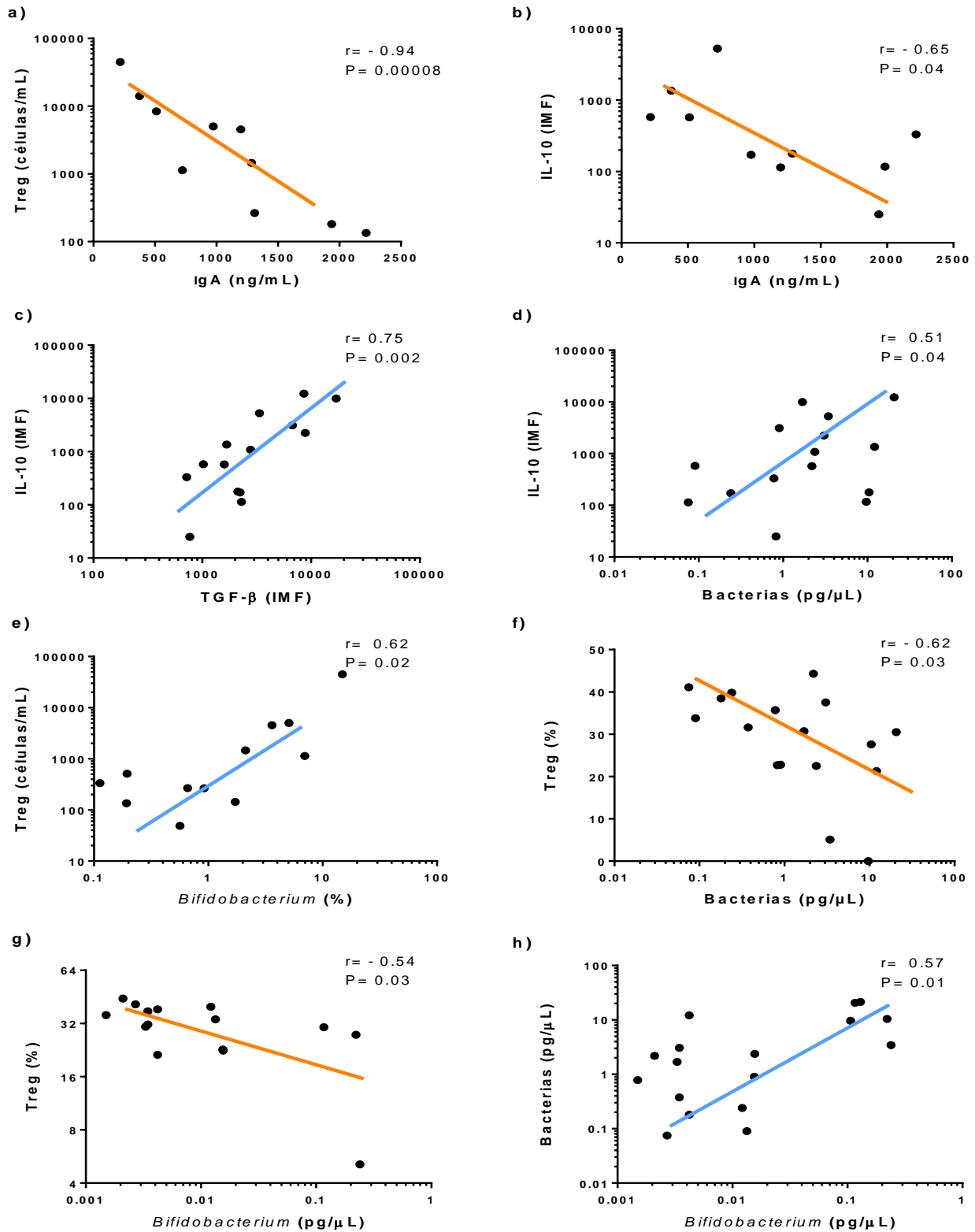


Figura 13. La presencia de Treg está inversamente relacionada con la concentración de IgAs, pero directamente con el predominio de Bifidobacterias. Las gráficas representan las pruebas de correlación biparamétricas de Spearman. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

DISCUSIÓN

El establecimiento y mantenimiento de una relación simbiótica con la microbiota intestinal es crucial para el desarrollo del sistema inmune. Los primeros días de nacimiento son particularmente críticos ya que los recién nacidos son inmediatamente expuestos a un amplio número de retos antigénicos. La colonización de bacterias comensales facilita la digestión, previenen infecciones y mejoran la función inmune del hospedero. Una de las vías más importantes para la colonización temprana es mediante la lactancia, que además de proveer nutrientes, induce la tolerancia a antígenos maternos, alimenticios y de bacterias comensales. Esta respuesta depende de las previas exposiciones antigénicas de la madre (incluyendo microorganismos comensales como *Bifidobacterium*) mediada por anticuerpos (principalmente IgA's) y recientemente se ha propuesto por la transferencia de los linfocitos Treg¹³¹; por lo que este trabajo busca la relación entre Treg, IgA's y bifidobacterias.

Múltiples son los factores que influyen en la composición de la leche materna. De interés en particular tiempo de gestación y vía de nacimiento impactan en la cantidad celular, tanto maternas como bacterianas.^{75, 78} En nuestros resultados observamos que el número de Treg, su fenotipo, y la concentración de IgAs no se modifica por el tiempo de gestación y vía de nacimiento, sin embargo, el porcentaje de bifidobacterias es mayor en la leche de madres que tuvieron un parto pretérmino. Este resultado puede deberse a los cambios hormonales (como la disminución de progesterona) y fisiológicos al final del embarazo de la lactogénesis II donde las células como macrófagos y células dendríticas transportan bacterias desde los nódulos linfáticos mesentéricos hasta la glándula mamaria^{233, 234}. Esto podría explicar las diferencias en la composición de la microbiota de partos pretérmino y término. En contraste con nuestros resultados, Pardo y colaboradores²³⁵ encontraron que en la leche materna de mujeres con parto pretérmino tuvieron una menor concentración de bacterias del género *Bifidobacterium* comparada con las del grupo término. La diferencia con estos resultados puede deberse a la ubicación geográfica de ambas poblaciones

(población Española vs Mexicana), que impacta en patrones como el estilo de vida o de la dieta que a su vez afectan la composición de la microbiota en la leche materna⁷⁸ o a cuestiones metodológicas ya que Pardo y colaboradores realizaron un concentrado del contenido celular mediante centrifugación para la extracción de DNA y nuestro estudio lo realiza la extracción del DNA a partir del calostro total.

La mayor concentración de bifidobacterias pudiera estar relacionado a la protección que tienen los niños prematuros frente a enfermedades inflamatorias, incluyendo enterocolitis necrosante, cuando la leche materna es rica en este género de bacterias²³⁶. Sumado a lo anterior, otros estudios demuestran que la suplementación con probióticos (como *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium animalis susp. lactis*) reduce la incidencia de enfermedades inflamatorias en los neonatos pretérmino^{236, 237}. La aportación de estas bacterias por el calostro enriquece bacterias del mismo género por la degradación de nutrientes de la misma leche que al mismo tiempo son utilizados como prebióticos²³⁸. Este hecho potenciaría el efecto protector que tiene la lactancia sobre enfermedades inflamatorias. Apoyando esta idea, la alimentación con leche materna a neonatos prematuros se relaciona con una microbiota balanceada²³⁸.

Como parte del modelo propuesto (IgAs-bacteria-Treg), lo correspondiente a la relación entre las IgA's y bacterias encontramos que la concentración e IgA's no se asocia con bacterias totales y bifidobacterias en calostro. Diversos estudios han reportado la estrecha relación que existe entre la concentración de IgA's frente a antígenos bacterianos específicos, principalmente patógenos (como ejemplo lipopolisacárido de *E.coli*²³⁹), sin embargo, nuestro estudio se limita a la cuantificación total de este subtipo por lo que no podríamos hacer la diferencia entre aquellos que tienen afinidad por agentes patógenos con efectos neutralizantes y opsonizantes, y de aquellos que favorecen la interacción de las bacterias comensales con el hospedero quienes ayudan a la colonización de bacterias comensales en el intestino neonatal²¹⁴. Por otra parte, nosotros evaluamos concentración total de IgAs sin considerar la afinidad y otros antígenos que pudieran estar involucrados como es el caso de los antígenos alimentarios¹⁸³,

²⁴⁰. El hecho de que no hayamos encontrado una relación directa entre ambas mediciones puede deberse a la heterogeneidad de la población respecto a las experiencias antigénicas que han tenido incluyendo vacunación, alimentación y enfermedades a lo largo de su vida²⁴¹ sumado a la diversidad de la microbiota de cada individuo que depende del estilo de vida y alimentación, entre otras^{242, 243, 244}.

Interesantemente encontramos que la presencia de los Treg, al igual que la expresión de IL-10 de Treg, se asocian de manera negativa con la presencia de IgA's en calostro. A diferencia de nuestros resultados en compartimentos como la mucosa intestinal, los linfocitos Treg son células que, por su localización, producen de forma activa citocinas como TGF- β e IL-10 que favorecen el isotipo IgA en células plasmáticas de centros germinales^{217, 245}. Considerando que el calostro no es un tejido linfoide (como el MALT) la relación inversa que tienen las Treg con IgA's pudiera deberse a factores de localización independientes unos de otro. Así por ejemplo los linfocitos T totales son atraídas a través de gradientes de quimiocinas (como ligandos de CCR9, CCR6, MAdCAM-1 y MCP1^{246, 247}) mientras que las IgA's son translocadas a través del receptor pIgR de la glándula mamaria al calostro²⁴⁸. Otros factores pueden estar involucrados incluyendo citocinas como IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6, y otros metabolitos como el ácido retinoico que ayudan a la quimiotaxis o la expresión del receptor pIgR, los cuales no fueron determinados en este estudio^{245, 249}. Además, la procedencia de los anticuerpos y células en calostro no se limita a el GALT. Se ha reportado que también estos anticuerpos pueden provenir de otras mucosas como el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT), incluyendo las adenoides y las amígdalas palatinas²⁵⁰. Por lo anterior, las IgA's en calostro pudieran provenir no solo del intestino, sino también de otras mucosas. Además, la relación inversa entre estos anticuerpos y Treg pudiera deberse a un mecanismo compensatorio, ya que se sabe que, en modelos murinos, los anticuerpos de la leche materna (IgG e IgA) limitan la respuesta de linfocitos B y T de lactantes frente a antígenos vacunales y de bacterias comensales²⁵¹. Por ello, bajas concentraciones de anticuerpos maternos en calostro pudieran establecer una respuesta inmune más robusta en el lactante que puede ser limitada por altos números de linfocitos Treg.

Adicionalmente, en este estudio encontramos que la expresión de IL-10 se relaciona directamente con la expresión de TGF- β en Treg. Ambas citocinas median funciones reguladoras actuando de forma sinérgica en el establecimiento del ambiente tolerogénico^{252,253}. Interesantemente observamos que la expresión de CD279 se asocia de forma negativa con los Treg. Cabe destacar que, dentro de la heterogeneidad de los linfocitos Treg, existen variaciones en los mecanismos que ayudan a establecer el ambiente tolerogénico incluyendo factores transcripcionales (como FoxP3), moléculas coestimuladoras como CD45RA y HLA-DR que ayudan a la producción diferencial de IL-10 y TGF- β ^{134, 254, 255}. De esta manera basados en la expresión diferencial de las moléculas mencionadas se han encontrado subtipos de Treg con variaciones en la expresión de CD152 y CD279^{133, 248}. En este trabajo nosotros nos limitamos a explorar los Treg con fenotipo CD4^{low}CD25⁺⁺ sin distinguir otras características fenotípicas. Por lo anterior, no se descarta la presencia de otros subtipos de Treg que puedan estar presentes en el calostro.

Por otra parte, encontramos que la presencia de bacterias se asocia de manera positiva con la expresión de IL-10, esta misma relación también se obtuvo entre la presencia de Treg y el porcentaje de bifidobacterias. Parte de los mecanismos que explican estos resultados podrían deberse a que tanto bacterias como linfocitos Treg son translocadas en conjunto a la glándula mamaria a través de la vía entero linfática-mamaria, ya que se ha observado que ciertos géneros bacterianos pueden viajar en células inmunes como células dendríticas y macrófagos^{132, 177}. De otros modelos como el intestinal se sabe SCFAs producidos por bacterias comensales favorecen la presencia de Treg y producción de IL-10²⁵⁶. Además, diversas moléculas de superficie (como EPS o el pili) de *Bifidobacterium* inducen moléculas inmunoreguladoras¹⁸⁷. Estudios realizados con mezcla de probióticos sugieren que los linfocitos Treg son generados a partir de células dendríticas reguladoras que expresan altos niveles de IL-10- TGF- β , COX-2 eIDO que son inducidas por probióticos (como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*²⁵⁷). Sumado a lo anterior, estudios en ratones tratados con una mezcla de diferentes lactobacilos y bifidobacterias incrementaron el porcentaje de linfocitos Treg en el

intestino¹³⁴. Bacterias como *Bacteroides fragilis* uno de los principales microorganismos comensales, facilitan la maduración de linfocitos Treg aumentando la producción de IL-10²⁵⁸. Estas evidencias pueden apoyar la hipótesis de que en el calostro tiene un ambiente inmunoregulador hacia bacterias comensales mediada por linfocitos Treg y a su vez puedan ser transferidos de manera conjunta al neonato.

En nuestros resultados encontramos que entre mayor concentración de bacterias mayor enriquecimiento de bifidobacterias. Para explicar resultado, se tiene que destacar que el establecimiento de un nicho bacteriano depende de mecanismos que favorezcan el mutualismo entre bacterias. Uno de los principales mecanismos es la alimentación cruzada ya sea mediante la utilización de productos metabólicos (como acetato, butirato o lactato) generados por bacterias como *Bifidobacterium* o la producción de sustratos menos complejos a partir del rompimiento de fuentes de energía complejas^{187, 259}. Como por ejemplo miembros bacterianos como *Veillonella* o *Propionibacterium* se desarrollan en presencia de metabolitos liberado por bifidobacterias como acetato o lactato²⁵⁹.

Como hemos recalado a lo largo del estudio los neonatos alimentados con leche materna tienen grandes cantidades de bifidobacterias, estas bacterias pueden asimilar específicamente HMOs²⁶⁰. De forma interesante, la capacidad de metabolizar estos oligosacáridos no está asociada con el dominio de cada especie. Por ejemplo, *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis longum* y *Bifidobacterium breve* son comúnmente encontradas como las especies dominantes en las heces del infante; sin embargo, muestran una limitada capacidad de asimilación de HMOs, en cambio géneros como el mayor consumo de HMOs son *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* que son menos abundantes en heces del infante, por lo tanto esto sugiere que la presencia de ciertas especies de bifidobacterias depende de las especies de bifidobacterias que puedan metabolizar HMOs²⁶¹.

Para reforzar lo planteado en el estudio, durante las primeras semanas de vida, las células de la leche materna pueden cruzar intactas a través de la barrera

intestinal neonatal³. Esto es debido a la disminuida actividad de las enzimas digestivas, bajos niveles de ácido clorhídrico en el estómago y débiles uniones intercelulares³ (uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas²⁶²) en las células epiteliales intestinales, todo esto permite la transferencia de células vivas de células maternas mediante la leche. Por ejemplo los macrófagos sobreviven varias horas en el tracto gastrointestinal de ratones infantiles después de ser administrados oralmente²⁶³. Los complejos celulares producidos durante las interacciones saliva-leche pueden proteger a las células de la leche materna de la acidez durante el tránsito gastrointestinal²⁶⁴. Se ha demostrado que existe la absorción activa de linfocitos vivos a través de la mucosa gástrica neonatal²⁶⁵. Por lo que cabe la posibilidad que los Treg presentes en calostro, transferidos al neonato mediante la lactancia materna, una vez que llegan al intestino neonatal podrían cumplir funciones de selección de IgA's contra bacterias comensales.

El estudio de la presencia de metabolitos (como SCFA) por parte de las bacterias comensales y componentes dietéticos son factores clave que podría ayudarnos a entender mejor la tolerancia que se genera en calostro debido a que influyen tanto en la inducción de Treg²⁶⁶ y la producción de IgA que de hecho es más específica que la que se produce en presencia de TGF- β 1²⁶⁷ como en la expresión de antígenos bacterianos²⁶⁸. Es muy probable que la falla en la selección de IgAs conduzca a cambios en la microbiota que podrían afectar la producción de metabolitos bacterianos que son requeridos para la inducción de subtipos linfocitos T efectores como FoxP3+, ROR γ t+ o FoxP3+ROR γ t+^{217, 269}. Por lo tanto, es importante recalcar que la producción de IgA, la inducción de Treg y expresión antigénica de las bacterias comensales depende de factores dietéticos que modifican la respuesta inmune, por ello para posteriores estudios, la dieta materna es un factor que también debe considerar.

Nuestro estudio es el primero en demostrar una asociación entre las IgA's, los linfocitos Treg y Bifidobacterias en calostro humano. Lo cual podría ayudar a entender de mejor manera la tolerancia generada hacia bacterias comensales, siendo el tiempo de gestación, un factor determinante en el grado de transferencia de bifidobacterias.

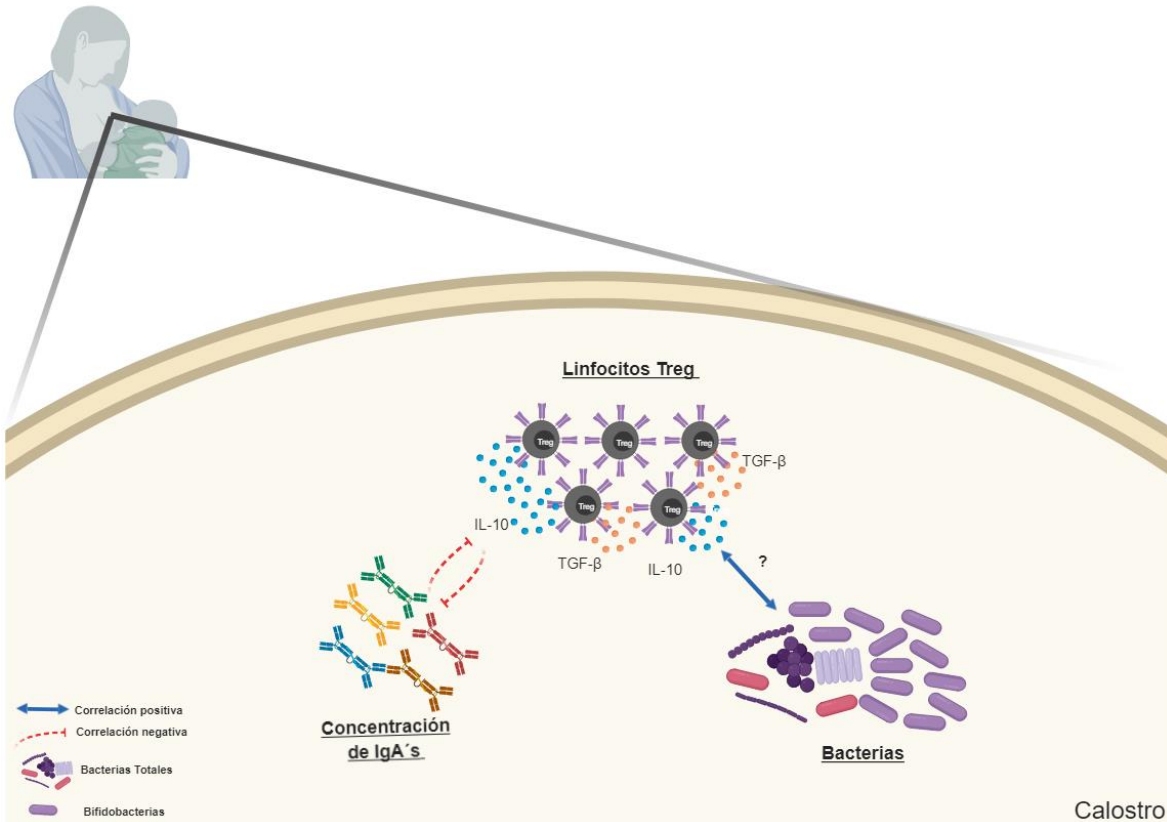


Figura 14. Relación Treg-IgA's-Bacterias en Calostro humano. La presencia de linfocitos Treg correlaciona con la presencia de bifidobacterias, del mismo modo, la producción de IL-10 pudiera mediar esta asociación. Sin embargo, la aparición de Treg merma la concentración de IgAs en calostro humano.

CONCLUSIÓN

La presencia de linfocitos Treg va acompañada de bacterias comensales y restricción de anticuerpos IgA's en calostro humano, siendo el embarazo pretérmino una condición que enriquece las bifidobacterias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oddy, W.H. Breastfeeding, Childhood Asthma, and Allergic Disease. *Annals of nutrition & metabolism* **70 Suppl 2**, 26-36 (2017).
2. Organization, W.H. Global strategy for infant and young child feeding. The optimal duration of exclusive breastfeeding *WHO* (2001).
3. Moles, J.P. *et al.* Breastmilk cell trafficking induces microchimerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* **29**, 133-143 (2018).
4. Martínez, T.G.d.C. Lactancia Materna en México *Academia Nacional de Medicina de México* 1-29 (2016).
5. Black, R.E. *et al.* Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet* **371**, 243-260 (2008).
6. Martorell, R., Melgar, P., Maluccio, J.A., Stein, A.D. & Rivera, J.A. The nutrition intervention improved adult human capital and economic productivity. *The Journal of nutrition* **140**, 411-414 (2010).
7. Black, R.E., Morris, S.S. & Bryce, J. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet* **361**, 2226-2234 (2003).
8. Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. WHO Collaborative Study Team on the Role of Breastfeeding on the Prevention of Infant Mortality. *Lancet* **355**, 451-455 (2000).
9. Ip, S. *et al.* Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evidence report/technology assessment*, 1-186 (2007).
10. Bland, K.I. La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas *Editorial Médica Panamericana* **1**, 57-61 (2007).
11. Hassiotou, F. & Geddes, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical anatomy* **26**, 29-48 (2013).
12. Suzuki, R. *et al.* Proliferation and differentiation in the human breast during pregnancy. *Differentiation; research in biological diversity* **66**, 106-115 (2000).

13. Neville, M.C., McFadden, T.B. & Forsyth, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **7**, 49-66 (2002).
14. LS, J. The role of prolactin in mammogenesis and lactogenesis *Adv Exp Med Biol* **80**, 173-191 (1977).
15. Lis, J. Proteins of human milk involved in immunological processes *Postepy Hig Med Dosw* **67**, 529-547 (2013).
16. Ballard, O. & Morrow, A.L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric clinics of North America* **60**, 49-74 (2013).
17. Field, C.J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *The Journal of nutrition* **135**, 1-4 (2005).
18. Donovan, S.M. The Role of Lactoferrin in Gastrointestinal and Immune Development and Function: A Preclinical Perspective. *The Journal of pediatrics* **173 Suppl**, S16-28 (2016).
19. Palmeira, P. & Carneiro-Sampaio, M. Immunology of breast milk. *Revista da Associacao Medica Brasileira* **62**, 584-593 (2016).
20. Henrick, B.M., Yao, X.D., Nasser, L., Roozrogousheh, A. & Rosenthal, K.L. Breastfeeding Behaviors and the Innate Immune System of Human Milk: Working Together to Protect Infants against Inflammation, HIV-1, and Other Infections. *Frontiers in immunology* **8**, 1631 (2017).
21. Zarembek, K.A. & Godowski, P.J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *Journal of immunology* **168**, 554-561 (2002).
22. Muzio, M., Polentarutti, N., Bosisio, D., Prahlanan, M.K. & Mantovani, A. Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *Journal of leukocyte biology* **67**, 450-456 (2000).
23. LeBouder, E. *et al.* Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *Journal of immunology* **171**, 6680-6689 (2003).

24. A, P. Regional variations in the composition of human milk. *Handbook of milk composition* 919 (1995).
25. Nommsen, L.A., Lovelady, C.A., Heinig, M.J., Lonnerdal, B. & Dewey, K.G. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. *The American journal of clinical nutrition* **53**, 457-465 (1991).
26. Lonnerdal, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American journal of clinical nutrition* **77**, 1537S-1543S (2003).
27. Lonnerdal, B., Woodhouse, L.R. & Glazier, C. Compartmentalization and quantitation of protein in human milk. *The Journal of nutrition* **117**, 1385-1395 (1987).
28. Mattila, P.E., Kinlough, C.L., Bruns, J.R., Weisz, O.A. & Hughey, R.P. MUC1 traverses apical recycling endosomes along the biosynthetic pathway in polarized MDCK cells. *Biological chemistry* **390**, 551-556 (2009).
29. Schack-Nielsen, L. & Michaelsen, K.F. Advances in our understanding of the biology of human milk and its effects on the offspring. *The Journal of nutrition* **137**, 503S-510S (2007).
30. Hosea Blewett, H.J., Cicalo, M.C., Holland, C.D. & Field, C.J. The immunological components of human milk. *Advances in food and nutrition research* **54**, 45-80 (2008).
31. Gao, X. *et al.* Temporal changes in milk proteomes reveal developing milk functions. *Journal of proteome research* **11**, 3897-3907 (2012).
32. Valentine, C.J. *et al.* Docosahexaenoic Acid and Amino Acid Contents in Pasteurized Donor Milk are Low for Preterm Infants. *The Journal of pediatrics* **157**, 906-910 (2010).
33. Andreas, N.J., Kampmann, B. & Mehring Le-Doare, K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early human development* **91**, 629-635 (2015).
34. Koletzko, B. *et al.* Physiological aspects of human milk lipids. *Early human development* **65 Suppl**, S3-S18 (2001).
35. Delplanque, B., Gibson, R., Koletzko, B., Lapillonne, A. & Strandvik, B. Lipid Quality in Infant Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **61**, 8-17 (2015).

36. Korotkova, M., Telemo, E., Hanson, L.A. & Strandvik, B. Modulation of neonatal immunological tolerance to ovalbumin by maternal essential fatty acid intake. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* **15**, 112-122 (2004).
37. Sharma, D. Human Milk: Its Components and Their Immunobiologic Functions *Mucosal Immunology* **2** 2307-2341 (2015).
38. Vasconcelos, A.G. Modulação e composição de ácidos graxos do leite humano. *Rev. Nutr.* **23**, 445-457 (2010).
39. Hernell, O., Timby, N., Domellof, M. & Lonnerdal, B. Clinical Benefits of Milk Fat Globule Membranes for Infants and Children. *The Journal of pediatrics* **173 Suppl**, S60-65 (2016).
40. Mutemberezi, V., Guillemot-Legris, O. & Muccioli, G.G. Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. *Progress in lipid research* **64**, 152-169 (2016).
41. Kinney, H.C., Karthigasan, J., Borenshteyn, N.I., Flax, J.D. & Kirschner, D.A. Myelination in the developing human brain: biochemical correlates. *Neurochemical research* **19**, 983-996 (1994).
42. Cartocci, V., Servadio, M., Trezza, V. & Pallottini, V. Can Cholesterol Metabolism Modulation Affect Brain Function and Behavior? *Journal of cellular physiology* **232**, 281-286 (2017).
43. Smilowitz, J.T., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., German, J.B. & Freeman, S.L. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annual review of nutrition* **34**, 143-169 (2014).
44. Obi, R.K. Nutritional Interventions in Reducing Morbidity and Mortality in People with Human Immunodeficiency Virus. *Health of HIV Infected Peoples* **1**, 483-507 (2015).
45. Williams, C.A. Galactose *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* **1** 2843-2846 (2003).
46. Newburg, D.S. Glycobiology of human milk. *Biochemistry. Biokhimiia* **78**, 771-785 (2013).
47. Kelleher, S.L. & Lonnerdal, B. Immunological activities associated with milk. *Advances in nutritional research* **10**, 39-65 (2001).

48. Newburg, D.S. Are all human milks created equal? Variation in human milk oligosaccharides. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **30**, 131-133 (2000).
49. Ward, R.E., Ninonuevo, M., Mills, D.A., Lebrilla, C.B. & German, J.B. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied and environmental microbiology* **72**, 4497-4499 (2006).
50. Marcobal, A. & Sonnenburg, J.L. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **18 Suppl 4**, 12-15 (2012).
51. Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. & Strobel, S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annual review of nutrition* **20**, 699-722 (2000).
52. Gnoth, M.J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E. & Rudloff, S. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *The Journal of nutrition* **130**, 3014-3020 (2000).
53. Rudloff, S., Pohlentz, G., Borsch, C., Lentze, M.J. & Kunz, C. Urinary excretion of in vivo (1)(3)C-labelled milk oligosaccharides in breastfed infants. *The British journal of nutrition* **107**, 957-963 (2012).
54. Albrecht, S., Schols, H.A., van den Heuvel, E.G., Voragen, A.G. & Gruppen, H. CE-LIF-MS n profiling of oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed babies. *Electrophoresis* **31**, 1264-1273 (2010).
55. Bode, L. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early human development* **91**, 619-622 (2015).
56. Coppa, G.V. *et al.* Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhi*. *Pediatric research* **59**, 377-382 (2006).
57. Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M., Jiang, X. & Newburg, D.S. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *The Journal of nutrition* **135**, 1304-1307 (2005).
58. Andersson, B., Porras, O., Hanson, L.A., Lagergard, T. & Svanborg-Eden, C. Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*

- by human milk and receptor oligosaccharides. *The Journal of infectious diseases* **153**, 232-237 (1986).
59. Martin-Sosa, S., Martin, M.J. & Hueso, P. The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains. *The Journal of nutrition* **132**, 3067-3072 (2002).
 60. Gonia, S. *et al.* Human Milk Oligosaccharides Inhibit *Candida albicans* Invasion of Human Premature Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of nutrition* **145**, 1992-1998 (2015).
 61. Lin, A.E. *et al.* Human milk oligosaccharides inhibit growth of group B *Streptococcus*. *The Journal of biological chemistry* **292**, 11243-11249 (2017).
 62. Kuntz, S., Rudloff, S. & Kunz, C. Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. *The British journal of nutrition* **99**, 462-471 (2008).
 63. Angeloni, S. *et al.* Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. *Glycobiology* **15**, 31-41 (2005).
 64. Autran, C.A., Schoterman, M.H., Jantscher-Krenn, E., Kamerling, J.P. & Bode, L. Sialylated galacto-oligosaccharides and 2'-fucosyllactose reduce necrotising enterocolitis in neonatal rats. *The British journal of nutrition* **116**, 294-299 (2016).
 65. Eiwegger, T. *et al.* Human milk--derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. *Pediatric research* **56**, 536-540 (2004).
 66. Eiwegger, T. *et al.* Prebiotic oligosaccharides: in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* **21**, 1179-1188 (2010).
 67. Aggett, P., Leach, J.L., Rueda, R. & MacLean, W.C., Jr. Innovation in infant formula development: a reassessment of ribonucleotides in 2002. *Nutrition* **19**, 375-384 (2003).
 68. Navarro, J. *et al.* Influence of dietary nucleotides on plasma immunoglobulin levels and lymphocyte subsets of preterm infants. *BioFactors* **10**, 67-76 (1999).
 69. Hess, J.R. & Greenberg, N.A. The role of nucleotides in the immune and gastrointestinal systems: potential clinical applications. *Nutrition in clinical practice* :

official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition **27**, 281-294 (2012).

70. Michaelsen, K.F., Skafte, L., Badsberg, J.H. & Jorgensen, M. Variation in macronutrients in human bank milk: influencing factors and implications for human milk banking. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **11**, 229-239 (1990).
71. Urbaniak, C., Angelini, M., Gloor, G.B. & Reid, G. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome* **4**, 1 (2016).
72. Mehta, R. & Petrova, A. Biologically active breast milk proteins in association with very preterm delivery and stage of lactation. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* **31**, 58-62 (2011).
73. Lonnerdal, B. Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. *Adv Exp Med Biol* **554**, 11-25 (2004).
74. Jin, Y.Y. *et al.* Characterization of immunocompetent cells in human milk of Han Chinese. *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association* **27**, 155-162 (2011).
75. Hassiotou, F. & Geddes, D.T. Immune cell-mediated protection of the mammary gland and the infant during breastfeeding. *Advances in nutrition* **6**, 267-275 (2015).
76. Trend, S. *et al.* Leukocyte Populations in Human Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry. *PloS one* **10**, e0135580 (2015).
77. Rodriguez, J.M. *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial ecology in health and disease* **26**, 26050 (2015).
78. Duranti, S. *et al.* Bifidobacterium vansinderenii sp. nov., isolated from faeces of emperor tamarin (Saguinus imperator). *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **67**, 3987-3995 (2017).
79. Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D. & Weaver, C.T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* **489**, 231-241 (2012).
80. Newburg, D.S. & Walker, W.A. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatric research* **61**, 2-8 (2007).
81. Asano, M. & Komiyama, K. Polymeric immunoglobulin receptor. *Journal of oral science* **53**, 147-156 (2011).

82. Vukavic, T. Timing of the gut closure. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **3**, 700-703 (1984).
83. Shahid, N.S. *et al.* Placental and breast transfer of antibodies after maternal immunization with polysaccharide meningococcal vaccine: a randomized, controlled evaluation. *Vaccine* **20**, 2404-2409 (2002).
84. Krakauer, R., Zinneman, H.H. & Hong, R. Deficiency of secretory Ig-A and intestinal malabsorption. *The American journal of gastroenterology* **64**, 319-323 (1975).
85. Ustundag B, Yilmaz E, Dogan Y, Akarsu S, Canatan H, Halifeoglu I, Cikim G, Aygun AD. Levels of cytokines (IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants. Mediators of inflammation. 2005; 2005(6):331– 336. [PubMed: 16489252]
86. Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, Perez-Cano FJ, Castell M, Moretones MG, LopezSabater MC, Franch A. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *The Journal of nutrition*. 2011; 141(6):1181–1187. [PubMed: 21508211]
87. Ustundag, B. *et al.* Levels of cytokines (IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants. *Mediators of inflammation* **2005**, 331-336 (2005).
88. Mizuno K, Hatsuno M, Aikawa K, Takeichi H, Himi T, Kaneko A, Kodaira K, Takahashi H, Itabashi K. Mastitis is associated with IL-6 Levels and milk fat globule size in breast milk. *J. Hum. Lact.* 2012
89. Agarwal, S., Karmaus, W., Davis, S. & Gangur, V. Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations. *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association* **27**, 171-186 (2011).
90. Meki A-RMA, Saleem TH, Al-Ghazali MH, Sayed AA. Interleukins -6, -8 and -10 and tumor necrosis factor alpha and its soluble receptor I in human milk at different periods of lactation. *Nutr. Res.* 2003; 23:845–855
91. Michie, C.A., Tantscher, E., Schall, T. & Rot, A. Physiological secretion of chemokines in human breast milk. *European cytokine network* **9**, 123-129 (1998).
92. Donnet-Hughes, A., Duc, N., Serrant, P., Vidal, K. & Schiffrin, E.J. Bioactive molecules in milk and their role in health and disease: the role of transforming growth factor-beta. *Immunology and cell biology* **78**, 74-79 (2000).

93. McNamee, E.N. *et al.* Noradrenaline acting at central beta-adrenoceptors induces interleukin-10 and suppressor of cytokine signaling-3 expression in rat brain: implications for neurodegeneration. *Brain, behavior, and immunity* **24**, 660-671 (2010).
94. Leposavic, G. *et al.* Catecholamines as immunomodulators: a role for adrenoceptor-mediated mechanisms in fine tuning of T-cell development. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* **144**, 1-12 (2008).
95. Arce-Sillas, A. *et al.* Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *Journal of immunology research* **2016**, 1720827 (2016).
96. Loebbermann, J. *et al.* IL-10 regulates viral lung immunopathology during acute respiratory syncytial virus infection in mice. *PloS one* **7**, e32371 (2012).
97. Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M. & Akdis, C.A. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* **117**, 433-442 (2006).
98. Palomares, O. *et al.* Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-beta. *Genes and immunity* **15**, 511-520 (2014).
99. Liu, W.H. *et al.* Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PloS one* **8**, e55487 (2013).
100. Sydora, B.C., Tavernini, M.M., Wessler, A., Jewell, L.D. & Fedorak, R.N. Lack of interleukin-10 leads to intestinal inflammation, independent of the time at which luminal microbial colonization occurs. *Inflammatory bowel diseases* **9**, 87-97 (2003).
101. Brenmoehl, J., Ohde, D., Wirthgen, E. & Hoeflich, A. Cytokines in milk and the role of TGF-beta. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **32**, 47-56 (2018).
102. Maheshwari, A. *et al.* TGF-beta2 suppresses macrophage cytokine production and mucosal inflammatory responses in the developing intestine. *Gastroenterology* **140**, 242-253 (2011).
103. Lombardero, M., Kovacs, K. & Scheithauer, B.W. Erythropoietin: a hormone with multiple functions. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* **78**, 41-53 (2011).

104. Loui, A. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) levels in early and mature human milk from mothers of preterm versus term infants. *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association* **28**, 522-528 (2012).
105. Gilmore, W.S. *et al.* Human milk contains granulocyte colony stimulating factor. *European journal of clinical nutrition* **48**, 222-224 (1994).
106. Gersting, J.A., Kotto-Kome, C.A., Du, Y., Christensen, R.D. & Calhoun, D.A. Bioavailability of granulocyte colony-stimulating factor administered enterally to suckling mice. *Pharmacological research* **48**, 643-647 (2003).
107. Houseknecht, K.L., Baile, C.A., Matteri, R.L. & Spurlock, M.E. The biology of leptin: a review. *J Anim Sci* **76**, 1405-1420 (1998).
108. Savino, F. & Liguori, S.A. Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin. *Clinical nutrition* **27**, 42-47 (2008).
109. Friedman, J.M. & Halaas, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763-770 (1998).
110. Fujinami, A. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin: resistin concentrations in normal subjects and patients with type 2 diabetes. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **339**, 57-63 (2004).
111. Hosogai, N. *et al.* Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* **56**, 901-911 (2007).
112. Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. & Walsh, K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* **14**, 561-566 (2003).
113. Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 85-97 (2011).
114. Sabbaj, S. *et al.* Breast milk-derived antigen-specific CD8+ T cells: an extralymphoid effector memory cell population in humans. *Journal of immunology* **174**, 2951-2956 (2005).
115. Tuailon, E. *et al.* Human milk-derived B cells: a highly activated switched memory cell population primed to secrete antibodies. *Journal of immunology* **182**, 7155-7162 (2009).

116. Goldman, A.S., Garza, C., Nichols, B.L. & Goldblum, R.M. Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. *The Journal of pediatrics* **100**, 563-567 (1982).
117. Goldman, A.S. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. *The Pediatric infectious disease journal* **12**, 664-671 (1993).
118. Michie, C.A. The long term effects of breastfeeding: A role for the cells in breast milk? *Tropical Pediatrics* **44**, 2-3 (1998).
119. Hsu, P.S. & Nanan, R. Does Breast Milk Nurture T Lymphocytes in Their Cradle? *Frontiers in pediatrics* **6**, 268 (2018).
120. Ghosh, M.K., Nguyen, V., Muller, H.K. & Walker, A.M. Maternal Milk T Cells Drive Development of Transgenerational Th1 Immunity in Offspring Thymus. *Journal of immunology* **197**, 2290-2296 (2016).
121. Cabinian, A. *et al.* Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant. *PloS one* **11**, e0156762 (2016).
122. Hanson, L.A. *et al.* Breast-feeding, a complex support system for the offspring. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* **44**, 347-352 (2002).
123. Wirt, D.P., Adkins, L.T., Palkowetz, K.H., Schmalstieg, F.C. & Goldman, A.S. Activated and memory T lymphocytes in human milk. *Cytometry* **13**, 282-290 (1992).
124. Bertotto, A. *et al.* Soluble CD30 antigen in human colostrum. *Biology of the neonate* **71**, 69-74 (1997).
125. Eglinton, B.A., Robertson, D.M. & Cummins, A.G. Phenotype of T cells, their soluble receptor levels, and cytokine profile of human breast milk. *Immunology and cell biology* **72**, 306-313 (1994).
126. Jain, L. *et al.* In vivo distribution of human milk leucocytes after ingestion by newborn baboons. *Archives of disease in childhood* **64**, 930-933 (1989).
127. Hawkes, J.S., Neumann, M.A. & Gibson, R.A. The effect of breast feeding on lymphocyte subpopulations in healthy term infants at 6 months of age. *Pediatric research* **45**, 648-651 (1999).

128. Jeppesen, D.L., Hasselbalch, H., Lisse, I.M., Ersboll, A.K. & Engelmann, M.D. T-lymphocyte subsets, thymic size and breastfeeding in infancy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* **15**, 127-132 (2004).
129. Kourtis, A.P. *et al.* Breast milk CD4+ T cells express high levels of C chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 4 and are preserved in HIV-infected mothers receiving highly active antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases* **195**, 965-972 (2007).
130. Bertotto, A., Castellucci, G., Fabietti, G., Scalise, F. & Vaccaro, R. Lymphocytes bearing the T cell receptor gamma delta in human breast milk. *Archives of disease in childhood* **65**, 1274-1275 (1990).
131. Cerbulo-Vazquez, A. *et al.* Characterization of CD127(-) CD25(++) Treg from human colostrum. *American journal of reproductive immunology* **79** (2018).
132. Parigi, S.M., Eldh, M., Larssen, P., Gabrielsson, S. & Villablanca, E.J. Breast Milk and Solid Food Shaping Intestinal Immunity. *Frontiers in immunology* **6**, 415 (2015).
133. Puddington, L. & Matson, A. Breathing easier with breast milk. *Nature medicine* **14**, 116-118 (2008).
134. Tanoue, T., Atarashi, K. & Honda, K. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nature reviews. Immunology* **16**, 295-309 (2016).
135. Taams, L.S. *et al.* Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology* **118**, 1-9 (2006).
136. Kiyohara, M. *et al.* alpha-N-acetylgalactosaminidase from infant-associated bifidobacteria belonging to novel glycoside hydrolase family 129 is implicated in alternative mucin degradation pathway. *The Journal of biological chemistry* **287**, 693-700 (2012).
137. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M.J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology* **8**, 1353-1362 (2007).
138. Tang, Q. & Bluestone, J.A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature immunology* **9**, 239-244 (2008).

139. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**, 775-787 (2008).
140. Ueda, H. *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* **423**, 506-511 (2003).
141. Martin, R. *et al.* Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of pediatrics* **143**, 754-758 (2003).
142. Kalliomaki, M., Collado, M.C., Salminen, S. & Isolauri, E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *The American journal of clinical nutrition* **87**, 534-538 (2008).
143. Collado, M.C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *Journal of clinical pathology* **62**, 264-269 (2009).
144. Arrieta, M.C., Stiemsma, L.T., Amenyogbe, N., Brown, E.M. & Finlay, B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in immunology* **5**, 427 (2014).
145. McCoy, K.D. & Thomson, C.A. The Impact of Maternal Microbes and Microbial Colonization in Early Life on Hematopoiesis. *Journal of immunology* **200**, 2519-2526 (2018).
146. Turfkruyer, M. & Verhasselt, V. Breast milk and its impact on maturation of the neonatal immune system. *Current opinion in infectious diseases* **28**, 199-206 (2015).
147. Gritz, E.C. & Bhandari, V. The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Frontiers in pediatrics* **3**, 17 (2015).
148. Patricia López, D.C.M., Miguel Gueimonde, Clara G. de los Reyes-Gavilán, Abelardo Margolles, Ana Suárez, Patricia Ruas-Madiedo. Exopolysaccharide-producing Bifidobacterium strains elicit different in vitro responses upon interaction with human cells. *Food Research International* **46**, 99-107 (2012).
149. Bank, U. *et al.* Cutting Edge: Innate Lymphoid Cells Suppress Homeostatic T Cell Expansion in Neonatal Mice. *Journal of immunology* **196**, 3532-3536 (2016).
150. Dingle, B.M. *et al.* FoxP3(+) regulatory T cells attenuate experimental necrotizing enterocolitis. *PloS one* **8**, e82963 (2013).

151. Timperi, E. *et al.* Expansion of activated regulatory T cells inversely correlates with clinical severity in septic neonates. *The Journal of allergy and clinical immunology* **137**, 1617-1620 e1616 (2016).
152. McCracken, V.J. & Lorenz, R.G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular microbiology* **3**, 1-11 (2001).
153. Walker, W.A. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Annals of nutrition & metabolism* **63 Suppl 2**, 8-15 (2013).
154. Artis, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature reviews. Immunology* **8**, 411-420 (2008).
155. McAuley, J.L. *et al.* MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *The Journal of clinical investigation* **117**, 2313-2324 (2007).
156. Shen, L. & Turner, J.R. Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **290**, G577-582 (2006).
157. Salzman, N.H., Ghosh, D., Huttner, K.M., Paterson, Y. & Bevins, C.L. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* **422**, 522-526 (2003).
158. Tao, Y. *et al.* Soluble factors from *Lactobacillus GG* activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology* **290**, C1018-1030 (2006).
159. Yan, F. & Polk, D.B. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **277**, 50959-50965 (2002).
160. Mirpuri, J. *et al.* Commensal *Escherichia coli* reduces epithelial apoptosis through IFN- α -mediated induction of guanylate binding protein-1 in human and murine models of developing intestine. *Journal of immunology* **184**, 7186-7195 (2010).
161. Kelly, D. *et al.* Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. *Nature immunology* **5**, 104-112 (2004).

162. Jakaitis, B.M. & Denning, P.W. Human breast milk and the gastrointestinal innate immune system. *Clinics in perinatology* **41**, 423-435 (2014).
163. Walker, W.A. & Iyengar, R.S. Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatric research* **77**, 220-228 (2015).
164. Urbaniak, C., Burton, J.P. & Reid, G. Breast, milk and microbes: a complex relationship that does not end with lactation. *Women's health* **8**, 385-398 (2012).
165. Rodriguez, J.M. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Advances in nutrition* **5**, 779-784 (2014).
166. Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S. & Isolauri, E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* **92**, 64-66 (2007).
167. Perez, P.F. *et al.* Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* **119**, e724-732 (2007).
168. Kulagina, E.V. *et al.* Molecular genetic study of species and strain variability in bifidobacteria population in intestinal microflora of breast-fed infants and their mothers. *Bulletin of experimental biology and medicine* **150**, 61-64 (2010).
169. Makino, H. *et al.* Transmission of intestinal Bifidobacterium longum subsp. longum strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Applied and environmental microbiology* **77**, 6788-6793 (2011).
170. Takahashi, H. *et al.* Comparative analysis of the properties of bifidobacterial isolates from fecal samples of mother-infant pairs. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **51**, 653-660 (2010).
171. Jimenez, E. *et al.* Oral administration of Lactobacillus strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and environmental microbiology* **74**, 4650-4655 (2008).
172. Abrahamsson, T.R., Sinkiewicz, G., Jakobsson, T., Fredrikson, M. & Bjorksten, B. Probiotic lactobacilli in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **49**, 349-354 (2009).
173. Jimenez, E. *et al.* Staphylococcus epidermidis: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC microbiology* **8**, 143 (2008).

174. Martin, V. *et al.* Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association* **28**, 36-44 (2012).
175. Albesharat, R., Ehrmann, M.A., Korakli, M., Yazaji, S. & Vogel, R.F. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and applied microbiology* **34**, 148-155 (2011).
176. Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C.P., Rochat, F. & Chassard, C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental microbiology* **16**, 2891-2904 (2014).
177. Fernandez, L. *et al.* The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological research* **69**, 1-10 (2013).
178. Rescigno, M. *et al.* Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology* **2**, 361-367 (2001).
179. Vazquez-Torres, A. *et al.* Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**, 804-808 (1999).
180. Macpherson, A.J. & Uhr, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* **303**, 1662-1665 (2004).
181. Dockrell, H.M. Roitt's essential immunology, 10th edition. I. M. Roitt & P. J. Delves. Oxford: Blackwell Science, 2001. xi+481pp. Price £24.95. ISBN 0-632-05902-8. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **96**, 108-108 (2002).
182. Bertotto, A., Gerli, R., Castellucci, G., Scalise, F. & Vaccaro, R. Human milk lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor are mostly delta TCS1-positive cells. *Immunology* **74**, 360-361 (1991).
183. Brandtzaeg, P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *The Journal of pediatrics* **156**, S8-15 (2010).
184. Langa, S. *et al.* Characterization of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a strain isolated from human milk: from genotype to phenotype. *Applied microbiology and biotechnology* **94**, 1279-1287 (2012).

185. Yi-Heng Chiu, J.-J.T., Shiao-Lin Lin, Chanita Chotirosvakin, Meei-Yn Lin. Characterisation of bifidobacteria with immunomodulatory properties isolated from human breast milk,. *Journal of Functional Foods* **7**, 700-708 (2014).
186. Milani, C. *et al.* The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **81** (2017).
187. Ruiz, L., Delgado, S., Ruas-Madiedo, P., Sanchez, B. & Margolles, A. Bifidobacteria and Their Molecular Communication with the Immune System. *Frontiers in microbiology* **8**, 2345 (2017).
188. Van Kruiningen, H.J., West, A.B., Freda, B.J. & Holmes, K.A. Distribution of Peyer's patches in the distal ileum. *Inflammatory bowel diseases* **8**, 180-185 (2002).
189. Milani, C. *et al.* Unveiling bifidobacterial biogeography across the mammalian branch of the tree of life. *The ISME journal* **11**, 2834-2847 (2017).
190. Lugli, G.A. *et al.* Comparative genomic and phylogenomic analyses of the Bifidobacteriaceae family. *BMC genomics* **18**, 568 (2017).
191. Ward, R.E., Ninonuevo, M., Mills, D.A., Lebrilla, C.B. & German, J.B. In vitro fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria. *Molecular nutrition & food research* **51**, 1398-1405 (2007).
192. Liepke, C. *et al.* Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *European journal of biochemistry* **269**, 712-718 (2002).
193. Oda, H. *et al.* Isolation of a bifidogenic peptide from the pepsin hydrolysate of bovine lactoferrin. *Applied and environmental microbiology* **79**, 1843-1849 (2013).
194. Garrido, D. *et al.* Endo-beta-N-acetylglucosaminidases from infant gut-associated bifidobacteria release complex N-glycans from human milk glycoproteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **11**, 775-785 (2012).
195. Chichlowski, M., De Lartigue, G., German, J.B., Raybould, H.E. & Mills, D.A. Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **55**, 321-327 (2012).
196. Kavanaugh, D.W. *et al.* Exposure of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* to Milk Oligosaccharides Increases Adhesion to Epithelial Cells and Induces a Substantial Transcriptional Response. *PLoS one* **8**, e67224 (2013).

197. Garrido, D., Barile, D. & Mills, D.A. A molecular basis for bifidobacterial enrichment in the infant gastrointestinal tract. *Advances in nutrition* **3**, 415S-421S (2012).
198. Asakuma, S. *et al.* Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *The Journal of biological chemistry* **286**, 34583-34592 (2011).
199. Strisciuglio, C. *et al.* Bifidobacteria Enhance Antigen Sampling and Processing by Dendritic Cells in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory bowel diseases* **21**, 1491-1498 (2015).
200. Srutkova, D. *et al.* Bifidobacterium longum CCM 7952 Promotes Epithelial Barrier Function and Prevents Acute DSS-Induced Colitis in Strictly Strain-Specific Manner. *PloS one* **10**, e0134050 (2015).
201. Tanabe, S., Kinuta, Y. & Saito, Y. Bifidobacterium infantis suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation. *International journal of molecular medicine* **22**, 181-185 (2008).
202. He, F. *et al.* Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by Bifidobacterium strains. *Microbiology and immunology* **46**, 781-785 (2002).
203. Lee, D.K. *et al.* In vitro evaluation of antibacterial activities and anti-inflammatory effects of Bifidobacterium spp. addressing acne vulgaris. *Archives of pharmacal research* **35**, 1065-1071 (2012).
204. capital Em, C.V.V. *et al.* The role of beneficial bacteria wall elasticity in regulating innate immune response. *The EPMA journal* **6**, 13 (2015).
205. Hidalgo-Cantabrana, C. *et al.* Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in Bifidobacterium spp. *Applied and environmental microbiology* **80**, 9-18 (2014).
206. Philippe, D., Heupel, E., Blum-Sperisen, S. & Riedel, C.U. Treatment with Bifidobacterium bifidum 17 partially protects mice from Th1-driven inflammation in a chemically induced model of colitis. *International journal of food microbiology* **149**, 45-49 (2011).
207. Laparra, J.M., Olivares, M., Gallina, O. & Sanz, Y. Bifidobacterium longum CECT 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. *PloS one* **7**, e30744 (2012).

208. Kim, J.H. *et al.* Extracellular vesicle-derived protein from *Bifidobacterium longum* alleviates food allergy through mast cell suppression. *The Journal of allergy and clinical immunology* **137**, 507-516 e508 (2016).
209. Ezendam, J., de Klerk, A., Gremmer, E.R. & van Loveren, H. Effects of *Bifidobacterium animalis* administered during lactation on allergic and autoimmune responses in rodents. *Clinical and experimental immunology* **154**, 424-431 (2008).
210. Vieira, A.T. *et al.* Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 51A reduced inflammation in a murine experimental model of gout. *Beneficial microbes* **6**, 799-806 (2015).
211. Moya-Perez, A., Neef, A. & Sanz, Y. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 Reduces Obesity-Associated Inflammation by Restoring the Lymphocyte-Macrophage Balance and Gut Microbiota Structure in High-Fat Diet-Fed Mice. *PLoS one* **10**, e0126976 (2015).
212. Lim, S.M. & Kim, D.H. *Bifidobacterium adolescentis* IM38 ameliorates high-fat diet-induced colitis in mice by inhibiting NF-kappaB activation and lipopolysaccharide production by gut microbiota. *Nutr Res* **41**, 86-96 (2017).
213. Feng, T., Elson, C.O. & Cong, Y. Treg cell-IgA axis in maintenance of host immune homeostasis with microbiota. *International immunopharmacology* **11**, 589-592 (2011).
214. Kubinak, J.L. & Round, J.L. Do antibodies select a healthy microbiota? *Nature reviews. Immunology* **16**, 767-774 (2016).
215. Kubinak, J.L. *et al.* MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health. *Cell host & microbe* **17**, 153-163 (2015).
216. Bunker, J.J. *et al.* Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity* **43**, 541-553 (2015).
217. Kawamoto, S. *et al.* Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* **41**, 152-165 (2014).
218. Kroese, F.G. *et al.* Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *International immunology* **1**, 75-84 (1989).
219. Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annual review of immunology* **29**, 621-663 (2011).

220. Kawamoto, S. *et al.* The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* **336**, 485-489 (2012).
221. Kato, L.M., Kawamoto, S., Maruya, M. & Fagarasan, S. Gut TFH and IgA: key players for regulation of bacterial communities and immune homeostasis. *Immunology and cell biology* **92**, 49-56 (2014).
222. Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagawa, O. & Suzuki, K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annual review of immunology* **28**, 243-273 (2010).
223. Josefowicz, S.Z. *et al.* Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* **482**, 395-399 (2012).
224. Tsuji, M. *et al.* Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* **323**, 1488-1492 (2009).
225. Cong, Y., Feng, T., Fujihashi, K., Schoeb, T.R. & Elson, C.O. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19256-19261 (2009).
226. Meijer, K., de Vos, P. & Priebe, M.G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **13**, 715-721 (2010).
227. Davie, J.R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *The Journal of nutrition* **133**, 2485S-2493S (2003).
228. Maslowski, K.M. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461**, 1282-1286 (2009).
229. Kullen, M.J., Sanozky-Dawes, R.B., Crowell, D.C. & Klaenhammer, T.R. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Journal of applied microbiology* **89**, 511-516 (2000).
230. Gueimonde, M., Tolkkio, S., Korpimäki, T. & Salminen, S. New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Applied and environmental microbiology* **70**, 4165-4169 (2004).
231. Kaufmann, P., Pfefferkorn, A., Teuber, M. & Meile, L. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S

- rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Applied and environmental microbiology* **63**, 1268-1273 (1997).
232. Sokol, H., Lepage, P., Seksik, P., Dore, J. & Marteau, P. Temperature gradient gel electrophoresis of fecal 16S rRNA reveals active *Escherichia coli* in the microbiota of patients with ulcerative colitis. *Journal of clinical microbiology* **44**, 3172-3177 (2006).
233. Lawrence, R.A. *Lactancia Materna. Una Guía para la profesión médica* Sexta Edición edn, 2007.
234. Jeurink, P.V. *et al.* Human milk: a source of more life than we imagine. *Beneficial microbes* **4**, 17-30 (2013).
235. Khodayar-Pardo, P., Mira-Pascual, L., Collado, M.C. & Martinez-Costa, C. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* **34**, 599-605 (2014).
236. Di Gioia, D., Aloisio, I., Mazzola, G. & Biavati, B. Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. *Applied microbiology and biotechnology* **98**, 563-577 (2014).
237. Deshpande, G., Rao, S., Patole, S. & Bulsara, M. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics* **125**, 921-930 (2010).
238. Korpela, K. *et al.* Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Scientific reports* **8**, 2453 (2018).
239. Nagao, A.T., Friedlander-Del Nero, D., Arslanian, C. & Carneiro-Sampaio, M.M. Elevated levels and different repertoire profile of colostral anti-LPS antibodies may have a significant role in compensating newborn immunity. *Scandinavian journal of immunology* **53**, 602-609 (2001).
240. Brandtzaeg, P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine* **21**, 3382-3388 (2003).
241. Moossavi, S. *et al.* Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. *Cell host & microbe* **25**, 324-335 e324 (2019).

242. Ishikawa, T. & Nanjo, F. Dietary cyclodextrin oligosaccharides enhance intestinal immunoglobulin A production in mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **73**, 677-682 (2009).
243. Gill, P.A., van Zelm, M.C., Muir, J.G. & Gibson, P.R. Review article: short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **48**, 15-34 (2018).
244. Cassani, B., Villablanca, E.J., De Calisto, J., Wang, S. & Mora, J.R. Vitamin A and immune regulation: role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance. *Molecular aspects of medicine* **33**, 63-76 (2012).
245. Cerutti, A. & Rescigno, M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* **28**, 740-750 (2008).
246. Pabst, O. Trafficking of regulatory T cells in the intestinal immune system. *International immunology* **25**, 139-143 (2013).
247. Nishimura, T. Expression of potential lymphocyte trafficking mediator molecules in the mammary gland. *Vet Res* **34**, 3-10 (2003).
248. Rogier, E.W. *et al.* Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 3074-3079 (2014).
249. Cerutti, A. The regulation of IgA class switching. *Nature reviews. Immunology* **8**, 421-434 (2008).
250. Brandtzaeg, P. & Pabst, R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends in immunology* **25**, 570-577 (2004).
251. Koch, M.A. *et al.* Maternal IgG and IgA Antibodies Dampen Mucosal T Helper Cell Responses in Early Life. *Cell* **165**, 827-841 (2016).
252. Lee, W. & Lee, G.R. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Exp Mol Med* **50**, e456 (2018).
253. Sharabi, A. *et al.* Regulatory T cells in the treatment of disease. *Nat Rev Drug Discov* (2018).

254. Jimenez, E. *et al.* Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Research in microbiology* **159**, 595-601 (2008).
255. Dong, S. *et al.* Multiparameter single-cell profiling of human CD4+FOXP3+ regulatory T-cell populations in homeostatic conditions and during graft-versus-host disease. *Blood* **122**, 1802-1812 (2013).
256. Vinolo, M.A., Rodrigues, H.G., Nachbar, R.T. & Curi, R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients* **3**, 858-876 (2011).
257. Kwon, H.K. *et al.* Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 2159-2164 (2010).
258. Round, J.L. & Mazmanian, S.K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 12204-12209 (2010).
259. Rios-Covian, D. *et al.* Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in microbiology* **7**, 185 (2016).
260. Turrone, F. *et al.* Glycan Utilization and Cross-Feeding Activities by Bifidobacteria. *Trends in microbiology* **26**, 339-350 (2018).
261. Gotoh, A. *et al.* Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with Bifidobacterium bifidum. *Scientific reports* **8**, 13958 (2018).
262. Laukoetter, M.G., Nava, P. & Nusrat, A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* **14**, 401-407 (2008).
263. Hughes, A., Brock, J.H., Parrott, D.M. & Cockburn, F. The interaction of infant formula with macrophages: effect on phagocytic activity, relationship to expression of class II MHC antigen and survival of orally administered macrophages in the neonatal gut. *Immunology* **64**, 213-218 (1988).
264. Southern, S.O. Milk-borne transmission of HIV. Characterization of productively infected cells in breast milk and interactions between milk and saliva. *Journal of human virology* **1**, 328-337 (1998).

265. Seelig, L.L., Jr. & Head, J.R. Uptake of lymphocytes fed to suckling rats. An autoradiographic study of the transit of labeled cells through the neonatal gastric mucosa. *Journal of reproductive immunology* **10**, 285-297 (1987).
266. Gu, Y. *et al.* Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes. *PloS one* **7**, e43691 (2012).
267. Seo, G.Y. *et al.* Retinoic acid, acting as a highly specific IgA isotype switch factor, cooperates with TGF-beta1 to enhance the overall IgA response. *Journal of leukocyte biology* **94**, 325-335 (2013).
268. Wegorzewska, M.M. *et al.* Diet modulates colonic T cell responses by regulating the expression of a Bacteroides thetaiotaomicron antigen. *Science immunology* **4** (2019).
269. Atarashi, K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* **331**, 337-341 (2011).

MATERIAL SUPLEMENTARIO

ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

TEXTO DECLARATIVO

Yo _____ declaro libremente que he sido informada de manera verbal y por escrito de los aspectos que se mencionan a continuación de la investigación titulada **“Influencia de los linfocitos T reguladores de calostro humano en la colonización de los géneros bacterianos *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* en el intestino de neonatos término y pre-término”**

- Justificación y objetivos de la investigación
- Procedimientos que van a usarse y su propósito con un lenguaje entendible para mí (representado), así como las responsabilidades que adquiero al participar
- Molestias y riesgos esperados
- Beneficios que puedan obtenerse
- La disponibilidad de tratamiento médico a la que tendría derecho por parte de la institución de atención a la salud
- El compromiso de proporcionarme información actualizada obtenida durante el estudio, aunque esta pudiera afectar mi voluntad para continuar participando
- Que, si existen gastos adicionales, derivados de este estudio de investigación, estos serán absueltos por el presupuesto de la misma
- La seguridad de que no se me identificará y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con mi privacidad de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares. Capítulo I de los Principios de
- Protección de Datos Personales, Artículo 6, 7, 8 y 9: y aviso de privacidad Institucional
- La libertad de retirar mi consentimiento in en cualquier momento sin que por ello se creen prejuicios para continuar mu cuidado y tratamientos
- Que en caso de no aceptar participar en la investigación no existirá ninguna responsabilidad, ni se verán afectados los derechos de atención médica presentes o futura
- La garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta o duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados a la investigación

Por lo anterior **SÍ** ___ o **NO**___ estoy de acuerdo en participar en la investigación arriba señalada firmando la declaración de consentimiento informado.

Nombre y firma del sujeto de investigación o su representante legal

Testigo 1

Nombre y firma

Parentesco

Domicilio

Testigo 2

Nombre y firma

Parentesco

Domicilio

Nombre y firma del investigador principal

Ciudad de México a ____ de _____ de _____

Tabla S1. Secuencias con altos porcentajes de identidad de los amplificadores de los iniciadores de bacterias totales.

| Iniciador (Sentido/Antisentido) | Descripción | Identidad (%) | Clave de Acceso Gen Bank |
|---|--|----------------------------|----------------------------|
| Sentido | <i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa HCD29-3 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | MH11607.1 |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa HCD26-3 gen para rRNA 16S secuencia parcial | 99 | MH111592.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> sp. cepa InS-282 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | KY964236.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> sp. EP_L_62 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | KJ642472.1 |
| | Cromosoma de <i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa SE95 | 99 | CP024437.1 |
| | Bacteria msa1-1 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | KT152827.1 |
| | Clon de Bacteria no cultivada ncd2272g12c1 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | JF200290.1 |
| | Bacteria NLAE-zl-P677 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 100 | JQ607535.1 |
| | Bacteria NLAE-zl-P71 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 100 | JQ607377.1 |
| | <i>Propionibacterium acnes</i> cepa 1202-14014 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | KP944184.1 |
| | Bacteria NLAE-zl-H42 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | JX006290.1 |
| | Bacteria NLAE-zl-G438 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | JX048429.1 |
| | Clon de actinobacteria no cultivada URO54.B06 gen para RNA 16S, secuencia parcial | 99 | JK473190.1 |
| | Clon de Bacteria no cultivada F46_4H gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | JQ512872.1 |
| | <i>Enterococcus faecium</i> cepa FFNL12 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | MH368250.1 |
| | <i>Enterococcus faecium</i> cepa ACD44-2 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | MH111695.1 |
| | <i>Enterococcus faecium</i> cepa ACD43-4 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | MH111692.1 |
| | <i>Enterococcus</i> sp. cepa TJ-1-11 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | MF157574.1 |
| | <i>Enterococcus lactis</i> cepa FC5 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | KU315086.1 |
| | <i>Lactobacillus brevis</i> cepa LABH 1 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | MF179529.1 |
| Clon de Bacteria no cultivada S17-4, gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | KY402150.1 | |
| Antisentido | <i>Staphylococcus</i> sp. RKVR_SS1 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | JX317679.1 |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa RKHC-78A gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | JQ282825.1 |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa iCTE621 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | DQ122332.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> sp. SRC_DSE8 16 S gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | GU797275.1 |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa ATCC 12228, genoma completo | 99 | CO022247.1 |
| | Cromosoma de <i>Staphylococcus epidermidis</i> SE90 | 99 | CP024408.1 |

| | | |
|---|----|----------------------------|
| Clon de Bacteria no cultivada PCS_158_321 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | JX850390.1 |
| Cromosoma <i>Cutibacterium acnes</i> cepa ATCC 6919, genoma completo | 99 | CP023676.1 |
| Clon de Bacteria no cultivada EHB-P0451 #3, gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | KU978284.1 |
| Clon de Bacteria no cultivada EHB-P0265 #08, gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | KU978237.1 |
| Cromosoma de <i>Cutibacterium acnes</i> cepa A1-14 | 99 | CP013693.1 |
| <i>Propionibacterium acnes</i> KPL1849 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | KF906602.1 |
| <i>Propionibacterium acnes</i> HL096PA1, genoma completo | 99 | CP003293.1 |
| <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11828, genoma completo | 99 | CP003084.1 |
| Cromosoma de <i>Enterococcus faecium</i> cepa CFSAN059071, genoma completo | 99 | CP020488.1 |
| Cromosoma de <i>Enterococcus faecium</i> cepa CFSAN059070, genoma completo | 99 | CP020484.1 |
| Cromosoma de <i>Enterococcus faecium</i> cepa AUSMDU00004024, genoma completo | 99 | CP027517.1 |
| <i>Enterococcus faecium</i> cepa ATCC 700221, genoma completo | 99 | CP014449.1 |
| <i>Enterococcus mundtii</i> cepa Acc3 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | KR269797.1 |
| Cromosoma de <i>Enterococcus hirae</i> cepa FDAARGOS_234, genoma completo | 99 | CP023011.2 |
| Clon de bacteria no cultivada GON1d01 gen para rRNA 16S, secuencia parcial | 99 | HM920453.1 |