



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

**IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES GÉNEROS FÚNGICOS
DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y SU RELACIÓN CON EL MODO
DE ALIMENTACIÓN EN LACTANTES SANOS**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA

LN SARA DEL CONSUELO ALMENDÁREZ LUNA

DIRECTOR DE TESIS

DR. FIDEL MARTÍNEZ GUTIÉRREZ



SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

FEBRERO, 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

**IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES GÉNEROS FÚNGICOS
DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y SU RELACIÓN CON EL MODO
DE ALIMENTACIÓN EN LACTANTES SANOS**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA

LN SARA DEL CONSUELO ALMENDÁREZ LUNA

COMITÉ TUTORIAL:

DIRECTOR: DR. FIDEL MARTÍNEZ GUTIÉRREZ

ASESORA: DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA

ASESORA: DRA. DIANA PATRICIA PORTALES PÉREZ

ASESOR CLÍNICO: DR. ABEL SALAZAR MARTÍNEZ



I. CREDITOS INSTITUCIONALES

Proyecto realizado con el apoyo de:

Fondo de Apoyo a la Investigación (FAI) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. Número de Convenio C20-FAI-10-34.34.

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT registro 003382, de nivel en desarrollo.

Beca otorgada por CONACYT, con Número CVU 1008301



Laboratorio de Antimicrobianos, Biopelículas y Probióticos, Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Consultorios particulares: Gastroenteróloga pediatra Dra. Claudia Leija, Pediatra Luz Adriana Najera. Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, departamento de pediatría. Gastroenterólogo pediatra Dr. Abel Salazar Martínez.



Identificación de los principales géneros fúngicos de la microbiota intestinal y su relación con el modo de alimentación en lactantes sanos. por Sara Del Consuelo Almendárez Luna se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.

II.

TESIS QUE PRESENTA

LN. SARA DEL CONSUELO ALMENDÁREZ LUNA

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS FRAMACOBIOLOGICAS

JURADO

DR. FIDEL MARTÍNEZ GUTIÉRREZ

DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA

DRA. DIANA PATRICIA PORTALES PÉREZ

DR. ABEL SALAZAR MARTÍNEZ

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

FEBRERO, 2022

IV. AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a Dios por cada experiencia vivida.

A la Facultad de Ciencias Químicas por abrirme sus puertas y continuar con mi aprendizaje, después de algunos años.

Al Dr. Fidel Martínez por permitirme ser su alumna, y por su acompañamiento en cada etapa difícil que pase en la Maestría, por su asesoría constante y conocimientos compartidos.

Quiero expresar mi admiración a la Dra. Ruth Elena Soria y a la Dra. Diana Portales que me inspiran y demuestran día a día el papel de la mujer en la Ciencia.

Gracias Dra. Ruth porque nunca me faltó asesoría, material ni espacio para experimentar.

Gracias Dra. Diana por permitirme un espacio dentro del laboratorio.

A mi sensei de vida y conocimientos Dr. Abel Salazar Martínez, que sin sus ideas no estuviera en este camino, gracias por ser mi familia.

Y hablando de familia, sin ellos no lo hubiese podido lograr, a mis hijos por su paciencia, por su sonrisa en los momentos estresantes. Una disculpa por los tiempos robados para ir a la recolección de las muestras, a mi esposo Oscar, que me impulsa con su ejemplo, por su optimismo, paciencia, esfuerzo y motivación. Engrandecen mi existir.

A mis padres por su apoyo incondicional, ¡Lo logre Papá! te dije que el sueño de la Maestría llegaría algún día.

La lista sería interminable, porque día a día mis compañeros de maestría aportaron a mi persona. Gracias amigos por su apoyo y paciencia.

A Luz Mila Martínez, Miguel Álvarez, Ernesto Martínez y Pedro Hernández que siempre tuvieron respuestas y Don para explicar.

A Marco Martínez por su aportación estadística para este trabajo.

Aprendí y recibí mucho más de lo que esperaba, tengan la seguridad, de cómo lo dije en la entrevista inicial, me daré a la tarea de transmitir el conocimiento a más estudiantes, que cada vez haya más profesionistas que se enamoren de lo que hacen que trasciendan y con su saber colaboren para un mundo mejor.

V. RESUMEN

En años recientes se ha comenzado a estudiar el componente fúngico de la microbiota intestinal, denominado micobiota, se conoce relativamente poco de los factores que influyen en su establecimiento en edades tempranas. En este trabajo se analizaron mediante PCR muestras fecales de recién nacidos sanos, de término, eutróficos, a los 2 y 4 meses de vida, con el objetivo de detectar cambios a través del tiempo en el ADN fúngico, con atención en 2 especies colonizadoras tempranas *Candida albicans* y *Debaryomyces hansenii*, y si el modo de alimentación influencia la presencia de estas especies.

Del total de participantes se detectó ADN fúngico en el 70% de las muestras, a los 2 meses de vida, incrementándose en un 100% a los 4 meses, independientemente del modo de alimentación. Interesantemente se reportó que en las muestras provenientes de participantes alimentados con lactancia materna exclusiva, se limitó la detección de *C. albicans*, mientras que *D. hansenii* se incrementa con el tiempo.

PALABRAS CLAVE: Micobiota intestinal, *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii*, lactancia materna.

ABSTRACT

In recent years, the fungal component of the gut microbiota has begun to be studied, relatively little is known about the factors that influence in the establishment an early life.

Fecal samples from healthy, full-term, eutrophic newborns at 2 and 4 months of life were analyzed by PCR, with the aim of detecting changes over time in fungal DNA, with attention to 2 early colonizing species *Candida albicans* y *Debaryomyces hansenii*, and if the mode of feeding influences the presence of these species.

We found detectable fungal DNA in 70% of the samples from participants at 2 months of age, increasing to 100% at 4 months, regardless of feeding mode. Exclusive breastfeeding limits the growth of *C. albicans*, while *D. hansenii* increases over time.

KEYWORDS: Gut micobiota, *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii*, Breastfeeding.

VII. INDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
1. Microbiota humana	1
2. Estudio de los hongos	3
3. Funciones de la microbiota intestinal	4
3.1 Metabolismo microbiano.....	5
4. Micobiota	6
4.1 Micobiota intestinal.....	7
4.2 Estudio de la micobiota intestinal.....	8
5. Colonización fúngica	8
5.1 Transferencia vertical madre-hijo.....	9
5.2 Micobiota infantil.....	9
5.3 Factores que modulan la micobiota.....	10
5.4 Disbiosis fúngica en población pediátrica.....	11
JUSTIFICACIÓN	12
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS PARTICULARES	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Población de estudio.....	13
Criterios de selección.....	13
Criterios de inclusión.....	13
Criterios de no inclusión.....	14
Criterios de eliminación.....	14
Recolección de muestras.....	14
Ingesta dietética.....	14
Antropometría.....	15
Cultivos.....	15
Extracción de ADN en levaduras.....	15

Extracción de ADN en muestras fecales.....	16
Determinación de la concentración, pureza y calidad del ADN extraído.....	16
Estandarización de oligonucleótidos.....	17
PCR.....	18
PCR en tiempo real.....	18
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	53
ANEXOS.....	57
Anexo 1 Hoja inicial de recolección de datos.....	57
Anexo 2 Cuestionario de seguimiento.....	58
Anexo 3 Método fenol cloroformo, para la extracción de ADN en heces fecales.....	59
Anexo 4 Procedimiento para Electroforesis en agarosa de ácidos nucleicos.....	61

INTRODUCCIÓN

La microbiota es una comunidad de microorganismos y virus que colonizan un determinado sitio anatómico del cuerpo humano, estableciendo relaciones entre sus componentes que conducen a un equilibrio dinámico entre ellos. Dentro de estos sitios anatómicos, la microbiota intestinal (MI), es caracterizada por la mayor diversidad microbiana. Un subcomponente de ésta es la micobiota, que comprende aproximadamente 140 géneros fúngicos, formando el 13% del volumen de la MI. Su composición dentro del huésped sano ha sido poco explorada. Los hongos confieren efectos fisiológicos al cuerpo humano, influyen en la inmunidad, facilitan la extracción de nutrientes y algunos como *Saccharomyces boulardii* es efectivo para prevenir y tratar enfermedades gastrointestinales humanas (Ward *et al.*, 2017).

ANTECEDENTES

1. Microbiota humana

La microbiota se define como una comunidad de microorganismos (mo) y virus que colonizan un determinado sitio anatómico del ser humano, estableciendo relaciones entre sus componentes microscópicos y las células del cuerpo humano, que conducen a un equilibrio dinámico entre ellos. Su composición es diferente dependiendo de la función de la superficie colonizada. Las microbiotas más estudiadas son la oral, la cutánea, la genitourinaria y la intestinal. En la microbiota intestinal (MI) se encuentra la mayor diversidad microbiana, que participa en múltiples procesos fisiológicos y patológicos del huésped. A pesar de la gran variedad de microorganismos, se estima que el 90 % pertenece a los filos procariotas *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Wasilewski *et al.*, 2015).

La microbiota intestinal tiene un papel importante en los procesos metabólicos, nutricionales, fisiológicos e inmunológicos del cuerpo humano. Participa en la defensa contra patógenos por mecanismos como la resistencia a la colonización y producción de compuestos antimicrobianos (Hooper *et al.*, 2012). Además, es la responsable de

la producción de nutrientes importantes como ácidos grasos de cadena corta (AGCC), vitaminas (vitamina K, vitamina B12 y ácido fólico) y derivados de aminoácidos (Oliphant & Allen-Vercoe., 2019).

Teniendo la microbiota intestinal esa diversidad de funciones resulta importante el entender cómo se establece, y los factores implicados en su evolución. La colonización del tracto gastrointestinal comienza desde el nacimiento, su composición cambia de manera gradual durante el crecimiento del individuo (Gerritsen *et al.*, 2011). Factores como el modo de nacimiento, la edad gestacional, la forma de alimentación y la exposición a los antibióticos dan forma a la microbiota en la vida temprana, esto contribuye a la salud futura (eubiosis) o estados de desbalance en el equilibrio microbiano (disbiosis). Esta evolución está sujeta a factores intrínsecos (edad y genética) y extrínsecos (índice de masa corporal, tabaquismo, alcoholismo, actividad física y dieta, entre otros) que definen su estado de salud (Ballan *et al.*, 2020). Una mala combinación de estos factores puede conducir a un desbalance en el equilibrio de composición de la microbiota intestinal, induciendo un estado de disbiosis que afectará de manera negativa la salud del individuo. Se ha demostrado la relación que se tiene en el estado de disbiosis con pacientes que cursan tanto enfermedades gastrointestinales como enfermedades sistémicas tales como: enfermedades cardiovasculares, enfermedad renal crónica, diabetes, cáncer y obesidad (Cavalcanti Neto *et al.*, 2018; Cerdó *et al.*, 2019). A nivel mundial y en nuestro país, estas enfermedades son las principales causas de mortalidad, es por ello que se busca el entendimiento de estos factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal en etapas tempranas de la vida.

2. Estudio de los hongos

Los hongos son organismos ampliamente distribuidos en el planeta, con una diversidad de características, para su estudio se les ha dividido en macromicetos (zetas) y micromicetos (estructuras microscópicas). Poseen núcleo por lo que se les agrupa dentro del dominio Eucaria, al igual que las células animales, vegetales y parásitos. Los hongos micromicetos se presentan como microorganismos unicelulares o levaduriformes y multicelulares o miceliares. Los hongos micromicetos miceliares están presentes en el medio ambiente, es conocido que participan en procesos naturales de descomposición de materia orgánica y reincorporación de los elementos a la cadena alimenticia. Dicha actividad de incorporar nuevamente algunos elementos a los ciclos correspondientes, les permite ser considerados como esenciales para sus plantas hospedantes porque absorben agua, nitrógeno, fósforo y otros nutrientes del suelo y los transfieren a las raíces de las plantas, estas asociaciones ocurren hasta en el 80% de todas las especies de plantas. Otros beneficios de los hongos multicelulares o miceliares y los unicelulares o levaduriformes, es su uso en procesos industriales, por ejemplo, los hongos miceliares son utilizados en la producción de antibióticos (*Penicillium chrysogenum*, *Cephalosporium acremonium* y *Streptomyces griseus*), mientras que los hongos levaduriformes son utilizados en la elaboración de pan, queso y bebidas alcohólicas (*Saccharomyces cerevisiae*). Por otro lado, se sabe que los hongos tienen una relación directa con la salud del ser humano, se estima que de los 5,1 millones de especies diferentes de hongos que se calcula existen en el mundo, solo unas 300 causan enfermedades de forma regular en los seres humanos (Blackwell M., 2011). Con la alta prevalencia de hongos en el medio ambiente, no es sorprendente que los hongos también se encuentren formando parte de la microbiota humana, con funciones específicas gracias a sus características de composición en su pared celular, ejemplo de ello son los polisacáridos llamados β -glucanos, los cuales tienen un efecto estimulante en la inmunidad (Otakar Rop *et al.*, 2009).

3. Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal (MI) lleva a cabo funciones metabólicas, antimicrobianas e inmunomoduladoras dentro del huésped.

Los microorganismos del tracto gastrointestinal descomponen carbohidratos complejos, proteínas y algunas grasas que llegan al colon al escapar de la digestión primaria, participan en la producción de enzimas relevantes para los procesos metabólicos (Hooper *et al.*, 2012).

En el complejo proceso de digestión y absorción, la MI interviene a través de diversas rutas metabólicas que incluyen hidrólisis, reducción, deshidrogenación y desaminación (Bryan *et al.*, 2013), y producción de metabolitos, entre los que se encuentran los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, butirato y propionato. Otros metabolitos producidos son formiato, alcoholes, amoníaco, ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR), aminas, compuestos de azufre, fenoles, indoles, derivados de glicerol y colina, dióxido de carbono e hidrógeno (Oliphant & Allen-Vercoe., 2019).

Una vez producidos estos AGCC, pueden ingresar a la circulación sistémica a través de células epiteliales por difusión pasiva y por mecanismos de transporte activo, se conoce su participación en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial a través de la regulación coordinada de proteínas de unión estrecha (Gibson *et al.*, 2017). Una disminución en la producción de estos compuestos se asocia a un aumento de la permeabilidad de la barrera, fenómeno conocido como translocación bacteriana, desencadenando una cascada inflamatoria. Un aumento en la concentración del lipopolisacárido (LPS), componente mayoritario de la pared celular de bacterias Gram negativas, provoca una cascada proinflamatoria mediada por el receptor Toll-like 4 (TLR 4) en las células inmunes (monocitos, macrófagos y células Kupffer), seguido de la activación de vías de señalización como el factor nuclear kappa B (NF- κ B), así como del aumento de la concentración de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP) produciendo inflamación por citocinas (Morrison & Preston., 2016).

La MI también contribuye a la regulación del sistema inmune del huésped. Esta función se deriva de la gran superficie de contacto que tiene la mucosa intestinal con antígenos del ambiente externo. La composición de la mucosa intestinal está conformada por el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés), agregados linfoides en el intestino grueso, así como células inmunes diseminadas en la lámina propia del tracto GI. Estas células están en contacto con el resto del sistema inmunitario a través de los ganglios linfáticos mesentéricos locales. El epitelio intestinal participa por medio de la activación de la inmunidad humoral, en la generación de la respuesta inmune con la producción de inmunoglobulinas secretoras y la diferenciación de células T a través del muestreo de antígenos extraños a través de receptores tipo Toll (TLR) y NOD (NLR) (Hooper *et al.*, 2012).

3.1 Metabolismo microbiano

Los AGCC son productos de la fermentación de fibra alimentaria y carbohidratos no digeribles (CND) que escapan de la digestión y absorción en el intestino delgado. Las diferentes especies presentes en la microbiota intestinal varían en sus capacidades para metabolizar los CND. En el caso de los microorganismos procariotes, como las bacterias, los compuestos disponibles son isomerados a su forma activa y son internalizados través de sistemas especializados (Pokusaeva *et al.*, 2011). Una vez dentro del citoplasma bacteriano los carbohidratos ingresan a alguna vía del metabolismo central como glicolisis, vía Embden-Meyerhof-Parnas, o la vía de las pentosas fosfato y son transformados a piruvato y acetyl fosfato. Otras rutas metabólicas pueden ser utilizadas, como la vía Entner-Doudorff y la vía de derivación bífida, que está presente en bacterias del género *Bifidobacterium*. Las bacterias ácido lácticas pueden producir únicamente ácido láctico a través de una homofermentación o una variedad de compuestos por heterofermentación (Markowiak-Kopec & Śliżewska., 2020).

En el caso de los hongos, que son células eucariotas, desarrollan un metabolismo heterótrofo, en el cual la fuente de carbono es a partir de moléculas orgánicas establecidas, al igual que la célula animal. La diferencia entre estos dos tipos de células eucariotas, es que en los hongos, la molécula orgánica no es ingerida y digerida internamente como en la célula animal. En el metabolismo de los hongos está implicado el uso de enzimas, las cuales son segregadas al medio, cumpliendo la función de hidrolizar las grandes moléculas orgánicas y derivado de ello producir moléculas de tamaño accesible, tal es el caso de monosacáridos, iones minerales entre otras. Una vez conformadas estas moléculas accesibles, el hongo las absorbe y dentro de la célula son utilizadas para su metabolismo. En poblaciones mixtas, como la microbiota intestinal, distintos microorganismos metabolizan los productos de la fermentación de un carbohidrato y producen compuestos diferentes. Los AGCC son producidos por este tipo de fermentación cruzada (Flint *et al.*, 2015; Markowiak-Kopeć & Śliżewska., 2020).

Si bien existe una “comunicación cruzada”, en donde los sustratos nutricios son utilizados por algunos microorganismos directamente y algunos otros utilizan los subproductos para su metabolismo, favoreciendo su crecimiento, existen mecanismos por los cuales los microorganismos limitan la presencia de otros microorganismos en la búsqueda de tener los nutrientes o los espacios de las células receptoras, tal es el caso de algunas bacterias lácticas que se contienen en la leche materna (Zeise *et al.*, 2019).

4. Micobiota

Uno de los principales componentes de la microbiota intestinal, son las bacterias; Sin embargo, a fechas recientes se ha evidenciado que existen otros componentes con relevancia en la colonización y funciones intestinales, desde los primeros momentos de la vida, tal es el caso de los hongos. La micobiota se refiere a la biota fúngica en un

determinado entorno, en el ser humano, es un componente de la Microbiota aunque constituye una pequeña porción comparada con las bacterias.

Aunque los hongos pueden ser patógenos humanos, especialmente en situaciones de inmunosupresión, muchos hongos son comensales benignos en múltiples partes del cuerpo, se ha identificado a *Candida albicans* como residente en la cavidad oral, vaginal y tracto gastrointestinal y *Malassezia globosa* en la piel (Ward *et al.*, 2017).

4.1 Micobiota intestinal

Aunque las bacterias constituyen la mayor biomasa humana, no son las únicas que contribuyen al ecosistema del huésped, en ese sentido se sabe que los hongos residentes del intestino humano adulto han sido reconocidos como una parte importante de la MI, comprenden aproximadamente el 13% del volumen microbiano intestinal, la mayoría de ellos pertenecientes al filo *Ascomycota* y *Basidiomycota*, con 140 géneros fúngicos diferentes (Hamad *et al.*, 2016).

Algunos géneros fúngicos confieren beneficios a la salud como *Saccharomyces boulardii* considerado como probiótico, (mo que en concentraciones adecuadas producen efectos benéficos en el hombre) eficaz para prevenir y tratar enfermedades gastrointestinales (GI) dentro de las cuales se encuentran: diarrea, enfermedad inflamatoria del intestino y síndrome del intestino irritable (Moré *et al.*, 2016).

Dentro del intestino los hongos se pueden dividir en residentes y en los que no lo son. Como requisito mínimo, un hongo residente (o autóctono) debe poder crecer a 37 ° C para colonizar el intestino, se han reportado principalmente especies del género de levaduras *Candida*, *Malassezia* y el hongo filamentoso *Cladosporium* como colonizadores potenciales.

Otros hongos comúnmente detectados provienen de la dieta o el medio ambiente, pero no pueden colonizar o no colonizan, *Penicillium* y algunas especies de *Debaryomyces*, que son comunes en los alimentos fermentados, pero no pueden crecer a la temperatura del cuerpo humano. Mientras que otros géneros tienen fuentes dietéticas o ambientales, tal es el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, un agente de fermentación

y en ocasiones probiótico, especies de *Aspergillus*, moho ubicuo, pero es probable que afecten la ecología intestinal (Hallen *et al.*, 2017).

4.2 Estudio de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal se puede estudiar a partir del análisis de los genes, de cada una de las diferentes especies de hongos que se encuentran en el intestino, lo cual recibe el nombre de microbioma intestinal. Para su estudio se han utilizado diferentes metodologías dependientes e independientes del cultivo, que involucran diferentes condiciones de crecimiento con variantes en los nutrientes, métodos de extracción de ADN y elección de cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para generar amplicones en el análisis de secuenciación.

La región ITS fúngica es el biomarcador más adecuado para la secuenciación de amplicones basada en secuenciación de próxima generación (NGS), para determinar la composición fúngica de una comunidad microbiana (Bates *et al.*, 2012).

Dentro de las metodologías de biología molecular que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa, se encuentra la variante cuantitativa o qPCR, la cual utiliza cebadores dirigidos a la región de ARNr de ITS1–5.8 S, estas regiones no son parte de las regiones transcritas conservadas de los ARN ribosómicos estructurales, son muy divergentes entre los hongos, con frecuencia son lo suficientemente diferentes como para clasificar los hongos a nivel de especie.

5. Colonización fúngica

Los primeros 1000 días de vida (desde la gestación hasta los 2 años de edad) son cruciales para la colonización y el establecimiento de la microbiota a lo largo del cuerpo humano. Estos microorganismos contribuyen al desarrollo y maduración del sistema inmunológico (Selma-Royo., 2019). El proceso de colonización en el recién nacido está influenciado por el sistema reproductivo de la madre, a lo que se le conoce como transferencia vertical madre-hijo, la piel materna, el medio ambiente y posteriormente por la dieta, incluida la lactancia materna (Rodríguez *et al.*, 2015).

5.1 Transferencia vertical Madre-Hijo

Se ha apoyado la teoría de que los hongos colonizan el intestino neonatal a través del canal de parto. Dentro de los primeros reportes de la colonización de hongos se encuentra el realizado por Bliss *et al.*, 2008, quienes reportaron que el género *Candida* se transmitía de manera vertical (de madre a hijo), pues la toma de muestra de ADN en la vagina, recto, cavidad oral y piel materna fué la misma que *Candida* en cavidad oral y el recto de los hijos. Estudios posteriores evidenciaron que microorganismos fúngicos como *C. albicans* y *Malassezia* spp. Se transfieren verticalmente de madre a hijo (Bliss J.M., 2008; Ward *et al.*, 2017).

Para comprender el establecimiento de los primeros hongos colonizadores se ha explorado la microbiota intestinal. Diversos estudios han evidenciado la presencia de los hongos en heces fecales de 298 binomios Madre-Hijo desde las 36 semanas de gestación hasta los 2 años de edad. El 88% de las madres y el 76% de los hijos tenían hongos intestinales detectables. En dicho estudio, 5 muestras con gran cantidad de ADN fúngico fueron secuenciadas de la región ITS1 del gen ARNr18 encontrando a *S. cerevisiae* como la especie fúngica más abundante en las madres y en los hijos de 1 a 2 años, mientras que *D.hansenii* dominó la microbiota intestinal de los hijos durante el periodo de lactancia. *Candida* spp, *Malassezia* spp y *Cladosporium* spp fueron géneros compartidos entre los binomios (Schei *et al.*, 2017).

5.2 Microbiota infantil

Se ha observado que los bebés y niños albergan una mayor riqueza de hongos en comparación con los adultos (Strati *et al.*, 2016). Esto depende del sitio anatómico estudiado, el microbioma oral es menos diverso comparado con los microbiomas cutáneos y anales, esto se analizó en una cohorte de lactantes de término sanos (n=17) mediante la secuenciación de amplicones ITS2, especies del género *Candida*, tales como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. albicans* y *C. orthopsilosis* fueron prevalentes en la microbiota de la piel del lactante; *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae*, *C. orthopsilosis*, *C. albicans* y *Cladosporium velox* en el microbioma oral

infantil; y *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *C. orthopsilosis* y *Cryptococcus pseudolongus* en el microbioma anal del lactante durante el primer mes de vida (Ward *et al.*, 2018).

5.3 Factores que modulan la microbiota

Los factores ambientales, la zona geográfica, el modo de nacimiento, la edad, el índice de masa corporal, el estilo de vida, el uso de antibióticos y la dieta tienen influencia sobre la composición de la microbiota intestinal. Sin embargo, los factores que influyen sobre la microbiota intestinal aún están siendo dilucidados.

Dentro de los factores más estudiados con influencia en la microbiota intestinal de los lactantes se encuentra la alimentación, la cual podría ser por fórmula o por leche materna. Esta última es un fluido biológico altamente complejo y dinámico rico en macronutrientes (Lípidos, proteínas y carbohidratos) micronutrientes (minerales, vitaminas, oligoelementos) y componentes bioactivos no nutritivos (células, inmunoglobulinas, citocinas, quimiocinas, hormonas, factores de crecimiento, glicanos, mucinas, etc.). Que proporciona protección contra la infección, la inflamación y contribuye a la maduración inmunológica, el desarrollo de órganos, la colonización de la microbiota y la salud infantil en general (Ballard O, *et al.*, 2013). Aunado al conocimiento de la presencia de bacterias lácticas en la leche materna, recientemente se ha identificado la presencia de hongos en muestras de leche de madres sanas. Los resultados del aislamiento por cultivo de hongos revelaron que el 41% de las muestras, (n=65) mostraron presencia de hongos viables. Mientras que los resultados arrojados por qPCR, utilizando cebadores dirigidos a la región de ARNr de ITS1–5.8 S mostraron que el 89% de las muestras tenían niveles detectables de ADN fúngico, presente en altas proporciones con una carga media de $3,5 \times 10^5$ células / mL.

Posteriormente analizaron un subconjunto de 15 muestras (qPCR-positivas para hongos) mediante pirosecuenciación del gen 28S rRNA, la asignación taxonómica de las secuencias mostró que la composición fúngica de la leche materna estuvo dominada por *Malassezia* spp, que correspondió al 44% del número total de

secuencias obtenidas, seguidas de *Candida* 19% y *Saccharomyces* 12% (Boix-Amorós *et al.*, 2017).

Por otro lado, la evidencia actual posiciona a la zona geográfica como un factor de importancia clave para el desarrollo de la microbiota intestinal. En un estudio realizado en población adulta residente en zonas rurales y urbanas de Sudáfrica, se estudió la microbiota fecal. En ambos grupos el filo *Ascomycota* fue predominante, *Pichia* fue mayor en la ubicación rural, mientras que *Candida* y *Cladosporium* predominaron en las zonas urbanas. En dicho estudio, se consideraron diversas variables que pudieran influir en la microbiota, el modo de nacimiento, lactancia materna, ubicación geográfica y tabaquismo, fueron las variables que explicaron las diferencias en la estructura de la comunidad fúngica entre ambas zonas (Kabwe *et al.*, 2020).

5.4 Disbiosis fúngica en población pediátrica

Algunos hongos colonizadores se han relacionado con resultados de salud, especies como *Candida* y *Rhodotorula* han sido vinculados a la atopia y asma, durante la colonización intestinal temprana (1-11 meses de edad) (Fujimura *et al.*, 2016).

En niños con sibilancias atópicas los taxones *Saccharomycetales* disminuyen mientras que la especie *Pichia kudriavzevii* aumenta, en comparación con los controles sanos, (Arrieta *et al.*, 2018).

JUSTIFICACIÓN

Existe poca evidencia científica del desarrollo de la microbiota intestinal en población pediátrica mexicana, los factores que contribuyen al establecimiento de los hongos en el cuerpo humano, así como la posible relación de su presencia con el desarrollo nutricional de los lactantes.

HIPÓTESIS

El modo de nacimiento, la forma de alimentación y factores ambientales influyen en la presencia de hongos en el intestino de los lactantes.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la presencia de ADN fúngico, ADN de *Candida albicans* y *Debaryomyces hansenni* a los 2 y 4 meses de vida, en muestras de heces fecales de lactantes sanos, nacidos por vía vaginal o cesárea, alimentados con lactancia materna exclusiva (LME) o lactancia mixta (LMM).

OBJETIVOS PARTICULARES

Búsqueda de oligonucleótidos, para la identificación de ADN fúngico.

Búsqueda de oligonucleótidos, para la identificación de *Candida albicans* y *Debaryomyces hansenni*.

Evaluar las características antropométricas de los lactantes y compararlas con tablas de crecimiento de la OMS.

Evaluar las características dietéticas de las madres lactantes.

Identificar las principales condiciones ambientales (Vivienda, servicios básicos y asistencia a estancias infantiles) de los participantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

El proyecto fue sometido y aprobado por el comité de Ética e Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, con registro en COFEPRIS 17 CI 24 028 093. Por razones de las medidas de seguridad implementadas en el Hospital Central derivadas de la pandemia por SARS-CoV-2, las cuales limitaban el acceso a dicho centro de atención médica a estudiantes, se reclutaron pacientes de población abierta, por lo que se vinculó el proyecto con médicos que atendían en la consulta privada, por lo que el protocolo se sometió al Comité Estatal de Ética en Investigación en Salud, dando la aprobación y registro (SLP/04-2020). De igual forma el protocolo fue registrado en el Comité de Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas (CEID-FCQ) (registro CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726), con la clave: CEID2020-010-S.

Se reclutaron lactantes sanos de término, eutróficos de 2 meses de edad que cumplieran los criterios de inclusión y se contará con la firma de la carta de consentimiento informado por la madre o tutor del lactante. Los participantes recibían atención en el Hospital Dr. Ignacio Morones Prieto y en consulta pediátrica privada en el Estado de San Luis Potosí.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Madre mayor de 18 años
- Recién nacido de término
- Alimentación al seno materno de manera exclusiva, con fórmula láctea (Fórmula de inicio) o ambos.

Criterios de no inclusión

- Lactante menor a 37 semanas de gestación.
- Alguna enfermedad que comprometa el crecimiento y desarrollo del lactante.
- Si en el periodo de gestación, al nacimiento o durante los primeros días de nacimiento, tanto la madre como el lactante hayan recibido tratamiento antimicrobiano.

Criterios de eliminación

- Lactante que haya iniciado tratamiento antibiótico o antifúngico, durante el periodo de estudio.
- Retiro voluntario de los padres.
- Pérdida de la muestra.

Recolección de muestras

Los pediatras participantes en el estudio establecieron el primer vínculo con las madres, llevando a cabo la primera recolección de datos (**Anexo 1**). Para el seguimiento de los datos y la recolección de las siguientes muestras, se dio seguimiento vía telefónica y visita domiciliaria (**Anexo 2**).

Se llevaron a cabo dos colectas de muestras a los 2 y 4 meses de vida, en el domicilio de los participantes. La muestra de heces fecales se tomó directo del pañal, en un microtubo de 1.5 mL, en un lapso no mayor a 2 h posterior a la evacuación.

Las muestras fueron etiquetadas y transportadas en hielera, la cual contenía el rótulo muestras biológicas, al Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSAB) de la UASLP, donde se alicuotaron con 300 µL de buffer de fosfatos y congeladas a -60°C hasta su uso posterior.

Ingesta dietética

Se evaluó la ingesta dietética de las madres lactantes con un recordatorio de 24 h, de tres días, la recolección de datos se apoyó con el uso de réplicas de alimentos para la observación de cantidades, métodos de cocción y marca de los alimentos.

La estimación de calorías, macro y micronutrientes se llevó a cabo usando el software Nutrikcal[®]. La separación de los platos en ingredientes se realizó antes de ingresar los datos en el software.

Antropometría

La antropometría de los lactantes se llevó a cabo en la consulta con los médicos pediatras participantes del estudio. La talla fue medida con infantómetro y el peso con báscula pediátrica.

La evaluación de los datos se realizó con las curvas de crecimiento de la Organización Mundial de la salud, con el software WHO Anthro.

Cultivos

Las cepas de referencias fueron donadas por el Cepario de la Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, quienes realizaron la identificación fenotípica y genotípica de *Candida albicans* y *Debaryomyces hansenni*. Dichas cepas se cultivaron en Agar Sabouraud Dextrosa (Dico TM ©) se incubaron a 37°C por 48 h. El agar fue preparado con 30 g en un litro de agua purificada, seguido de 15 min en Autoclave a 121°C.

Extracción de ADN de levaduras

La extracción de ADN de cada una de las levaduras se realizó, con el método fenol-cloroformo y con PureLink™ Genomic DNA Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante, se decidió utilizar el ADN con esta última extracción.

La concentración de DNA fue medida en Thermo Scientific™ *NanoDrop 2000* y se verificó su calidad en gel de agarosa al 1 %.

Extracción de ADN en las muestras

Se realizó una búsqueda de protocolos para la extracción de ADN en muestras de heces fecales, estandarizándose el método fenol-cloroformo, integrando algunos pasos del método con batido de perlas de vidrio $\leq 106 \mu\text{m}$ (Scalan, *et al.*, 2008) durante la lisis. La metodología y la integridad de algunas de las muestras pueden ser observadas en el **anexo 3**.

Determinación de la concentración, pureza y calidad de ADN extraído

La concentración de ADN en la muestra se cuantificó por espectrofotometría, en un Thermo Scientific™ *NanoDrop 2000*. Este método analítico determina la concentración y la pureza de ADN en una muestra, basándose en la capacidad de absorción de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada. La concentración de ADN en la muestra se calcula teniendo en cuenta el valor de absorción obtenido a una longitud de onda de 260nm. La relación de absorciones A260/280 y A260/230 son utilizados para evaluar la pureza de muestras.

La relación A260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1.6. Un valor A260/280 < 1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. A 230nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos. En general, se considera que el ADN es puro cuando el ratio A260/230 se sitúa en torno 1.8-2.2. Un ratio menor de 1.8 se relaciona con presencia de contaminantes en la muestra. (Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN).

Algunas de las muestras fueron descartadas por no cumplir con esta relación, se puede observar en la tabla **S1** del material suplementario los valores de concentración y pureza en las muestras de los participantes, la mayoría de ellas con una relación 260/280 aceptable. El ratio 260/230 fue bajo, probablemente relacionado por el método de extracción utilizado. Sin embargo, se decidió su utilidad, por conservar integridad, la cual fue verificada en gel de agarosa al 1% (**Anexo 4**).

Todas las muestras fueron ajustadas a una concentración de 100 ng de ADN.

Estandarización de oligonucleótidos

La selección de oligonucleótidos para la identificación de *Candida albicans* y *Debaryomyces hansenii* se realizó mediante una búsqueda en la base de datos del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

Los oligonucleótidos ITS1 and ITS4 fueron utilizados como control positivo para la detección de ADN fúngico. (Monroy-Pérez *et al.*, 2020). La temperatura de fusión, contenido de guanina-citosina y auto complementariedad fueron verificados utilizando la herramienta OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator. Los oligonucleótidos sentido y antisentido, sintetizados por Sigma-Aldrich se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar la región gen de ARN ribosómico de la subunidad pequeña 5.8S.

Nombre	Secuencia (5' -3')	Región a amplificar	Tamaño del producto de PCR (pb)
ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	<i>Candida albicans</i> gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña 5.8S	536
ITS 1 ITS 4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	<i>Debaryomyces hansenii</i> gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña 5.8S	650
CAL-M CAL2	TTT CAA CGG ATC TCT TGG ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG	5.8S ribosomal RNA <i>Candida albicans</i>	230

PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

La estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de las regiones ya mencionadas en el ADN de los cultivos, se llevó a cabo en un volumen final de 15 μL , que incluía: 0.3 μL de Taq Polimerasa, 0.3 μL , de oligonucleótido sentido, 0.3 μL de oligonucleótido antisentido (10 mMol), 9.8 μL agua libre de ADNAsas y 1 μL de DNA plantilla con una concentración de 45ng.

Las condiciones de reacción para las muestras fueron un volumen final de 15 μL , que incluía: 0.3 μL de Taq Polimerasa, 0.3 μL , de oligonucleótido sentido, 0.3 μL de oligonucleótido antisentido (10 mMol), 9.8 μL agua libre de ADNAsas y 1 μL de DNA plantilla en dilución 1:10.

Las condiciones de termociclaje para el ADN de los cultivos como de las muestras fueron: desnaturalización inicial 95°C a 5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C 30s, 57°C (ITS), 55°C (*C.albicans*), por 30 s, 72°C por 1 min, con una extensión final de 72°C durante 5 min. El producto de amplificación fue visualizado en gel de agarosa al 2%.

PCR tiempo real:

La amplificación de las muestras en tiempo real se llevó a cabo por duplicado en un Termociclador Biorad CFX96, con las siguientes condiciones de reacción: 5 μL SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems®, 3 μL de agua libre de ADNAsas, 0.5 μL de oligonucleótido sentido, 0.5 μL de oligonucleótido antisentido (10 mMol) y 1 μL DNA plantilla en una dilución 1:100 con un volumen final de 10 μL .

Para determinar la especificidad de amplificación por sybr Green, se realizó una curva de disociación bajo los siguientes parámetros de termociclaje: Desnaturalización inicial 95°C a 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C 30 s, 57°C por 30 s, 72°C por 1 min, con una extensión final de 72°C durante 5 min.

Los resultados fueron analizados con el software Bio-Rad CFX manager versión 3.1.

RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio un total de 10 lactantes, tanto la forma de nacimiento como su alimentación fue decisión de los padres y del médico tratante. Del total de la población estudiada, 4 fueron nacidos en el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, mientras que los restantes fueron atendidos en Hospitales privados de la ciudad de San Luis Potosí. Llama la atención que 70% de los nacimientos fueron por cesárea, la mayoría de ellos provenientes de hospitales privados (Tabla 2).

Para probar la normalidad de los datos se utilizó el test de Shapiro-wilk, las variables categóricas fueron analizadas con la prueba de Fisher y las variables cuantitativas con t de student, utilizando el software GraphPad versión 5, estableciendo el nivel de significancia cuando $p < 0.05$.

Tabla 2. Características de madres e hijos participantes.

Características	Lactancia Materna Exclusiva (LME)	Lactancia Materna Mixta (LMM)	Valor de P
Número de participantes	5	5	
Edad Materna	28.2 ± 6.7	31.8 ± 4.1	0.26
IMC kg / m ²	27.8 ± 4	30.4 ± 5.8	0.25
Realizó actividad física durante el embarazo	1 (20)	1 (20)	1
Condiciones de vivienda			
Urbana	4 (80)	4 (80)	1
Terracería	0	1 (20)	
Sexo del infante			
Femenino	3 (60)	2 (40)	1
Masculino	2 (40)	3 (60)	
Semanas de gestación	39.5 ± 1.4	38.5 ± 1.3	0.39
Modo de nacimiento			
Cesárea	2 (40)	5 (100)	0.16
Vaginal	3 (60)	0	
Mascotas			
Convive con mascotas	2 (40)	3 (60)	1

Valores expresados como mediana, desviación estándar o porcentaje.

Amplificación de ITS en *C. albicans* y *D.hansenii*

El tamaño de amplicón dada por los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 varía dependiendo de cada especie. Una vez realizada la extracción de ADN de los cultivos puros, se llevó a cabo una búsqueda en BLAST del gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña 5.8S en *Candida albicans* y *Debaryomyces hansenii* para obtener el tamaño de amplicón para cada una de las especies, resultando 536 pb y 650 pb respectivamente, los cuales fueron corroborados con una PCR en punto final (figuras 1, 1.1, 1.2). El tamaño de los amplicones observado fue igual al esperado en el carril 2 y 3 para *C.albicans* y carril 4 *D. hansenii* en la figura 1.

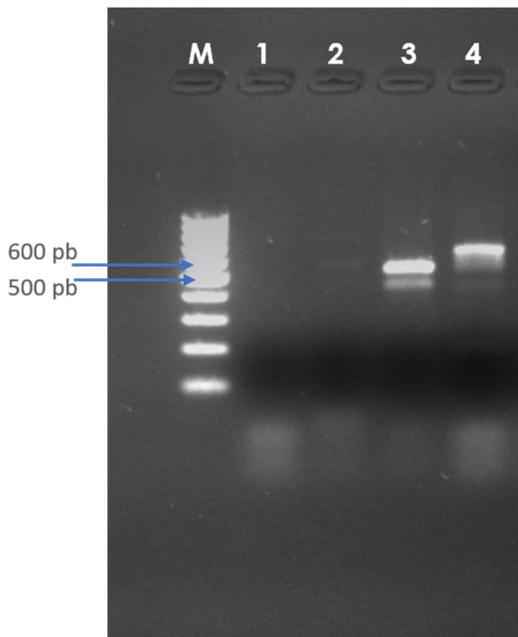


Fig.1 Productos de amplificación del gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña 5.8S para *C. albicans* (carril 2 y 3) y *Debaryomyces hansenii* (carril 4) Marcador de 100 pb, (M) control negativo (carril 1).

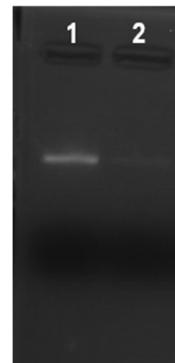


Fig.1.1 Producto de amplificación del gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña 5.8S para *C. albicans* carril 1 y 2

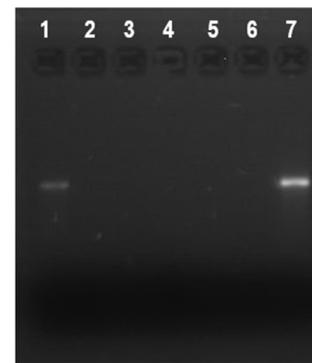


Fig.1.2 Producto de amplificación del gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña 5.8S para *Debaryomyces hansenii* (carril 1 y 7). Carriles 2-6 sin productos de amplificación.

Presencia de ADN fúngico

Los resultados de la detección de ADN fúngico, por qPCR mostraron un 70% de muestras positivas a los 2 meses de vida mientras que, a los 4 meses, el ADN fúngico se detectó en el 100% de las muestras, en la figura 2 se muestra una tabla con la identificación de los participantes con un número y color asignado, la temperatura de desnaturalización del producto y el número de ciclo de amplificación.

Fig.2 Curvas de disociación, del gen ARN ribosómico de subunidad pequeña 5.8S, (oligonucleótidos ITS1 e ITS4) **A.** Curva de disociación de las muestras a los 2 meses de vida **A-1** Derivada negativa de la fluorescencia, el pico indica la temperatura de desnaturalización del producto en cada una de las muestras. Muestras por duplicado **B.** Curva de disociación de las muestras a los 4 meses de vida **B-1** Derivada negativa de la fluorescencia, el pico indica la temperatura de desnaturalización del producto en cada una de las muestras. Muestras por duplicado.

Modo de alimentación

El análisis de los participantes según su modo de alimentación refleja que los lactantes dentro del grupo de lactancia materna mixta tienen un mayor porcentaje de ADN fúngico positivo, en las muestras analizadas a los 2 meses, respecto a los alimentados con leche materna exclusiva. El análisis de las muestras de los participantes a los 4 meses refleja que el ADN fúngico es detectado en el 100% de las muestras independientemente del modo de alimentación (Gráfica 1). Los datos se analizaron mediante tablas de contingencia, con la prueba de Fisher con el software Graph Pad versión 5.

Gráfica 1 Datos de los participantes agrupados según el modo de alimentación a los 2 y 4 meses de vida. **LME** (Lactancia materna exclusiva) **LMM** (Lactancia materna mixta). Entre () expresados como porcentaje.

Modo de nacimiento

Se analizaron las primeras muestras de heces fecales después del nacimiento, sin embargo, la detección del material genético en dichas muestras no fue posible, por la poca cantidad de contenido fecal y valores por debajo de lo aceptable en la relación A260/280 y 260/230, tanto en lactantes nacidos por cesárea como por vía vaginal.

En ese contexto, se analizaron las muestras a los 2 meses de vida, encontrando que el 71.4% de los nacidos por cesárea presentan ADN fúngico positivo respecto al 66% nacidos por vía vaginal (Gráfica 2).

Gráfica 2. Datos de los participantes agrupados según el modo de nacimiento a los 2 meses de vida. Entre () expresados como porcentaje.

Condiciones de vivienda

Al analizar las condiciones de vivienda, se encontró que todos los participantes contaban con servicios básicos de agua y drenaje, sin embargo, algunos de ellos habitaban zonas sin pavimentación, agrupándose en el grupo de terracería. Se detectó ADN fúngico en el 85.7% de los participantes de zonas urbanas, respecto al 50% de los habitantes en zona de terracería (Gráfica 3).

Ninguno de los lactantes acudía a estancias infantiles, los cuidadores eran la madre o familiares cercanos.

Gráfica 3. Datos de los participantes agrupados según las características de vivienda a los 2 meses de vida. Entre () expresados como porcentaje.

Detección de *Candida albicans*

Al valorar la presencia de *Candida albicans* en las muestras de 2 y 4 meses por PCR, se obtuvieron productos de amplificación de 230 pb del gen 5.8S ribosomal RNA (Figura 3). De la totalidad de la población de estudio la presencia de *Candida albicans* se identificó en el 50% de los participantes a los 2 meses de edad, mientras que a los 4 meses este porcentaje disminuye a 10%. Al realizar el análisis basado en los dos grupos de alimentación, se encontró que en el grupo de Lactancia materna exclusiva la detección de *C. albicans* fue del 60% de los participantes a los 2 meses, esta detección disminuye a 20% a los 4 meses de vida. Mientras que en el grupo de lactancia materna mixta el 40% de los participantes fue positivo a los 2 meses y no se tuvo detección a los 4 meses (Gráfica 4).

Gráfica 4. Detección de *C. albicans* participantes agrupados según el modo de alimentación a los 2 y 4 meses de vida. **LME** (Lactancia materna exclusiva) **LMM** (Lactancia materna mixta). Entre () expresados como porcentaje.

En cuanto al modo de nacimiento 70% de los participantes nacieron vía cesárea, dentro de estos el 43% fue positivo a *C.albicans* (Gráfica 5).

Gráfica 5. Datos de los participantes agrupados según el modo de nacimiento para *C. albicans* a los 2 meses de vida. Entre () expresados como porcentaje.

Fig.3 Productos de amplificación de *C. albicans* 5.8S ribosomal, M: marcador de 100 pb.

(+) control positivo. P: Participante, el número seguido del guion indica los meses de los participantes. Carril 1 P1-4, carril 2 P5-2, carril 3 P9-2, carril 4 P10-2, carril 5 P6-2 y carril 8 P8-2. Carriles 9 y 10 ejemplo de muestras en donde no se obtuvieron productos de amplificación.

Detección de *Debaryomyces hansenii*

La presencia de *Debaryomyces hansenii* fue identificada por PCR, en su región constitutiva ARN ribosómico de subunidad pequeña 5.8S obteniendo productos de amplificación de 650 pb (Figura 4). Se pueden observar diferentes bandas en el control positivo, posiblemente el control fue contaminado, es por ello que se consideraron positivas las muestras de aquellos pacientes cuyos productos de PCR correspondían a un tamaño de 650 pb. En el carril 2, 6 y 13 se pueden observar bandas con distintos tamaños, que probablemente correspondan a otras especies fúngicas. No se identificó *Debaryomyces hansenii* en el grupo de lactancia materna exclusiva a los 2 meses, mientras que a los 4 se identificó presuntivamente en el 40% de este grupo. Mientras que en los lactantes con lactancia materna mixta se incrementó de un 40% a los 2 meses a 60% a los 4 meses (Gráfica 6)

Fig.4 Productos de amplificación del gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña 5.8S para *Debaryomyces hansenii*, M: marcador de 100 pb. (+) control positivo, (-) control negativo P: Participante, el número seguido del guion indica los meses de los participantes. Carril 2 P 4-4, carril 4 P8-2, carril 5 P3-2, carril 6 P7-4, carril 13 P5-4, carril 15 P3-4, carril 20 P2-4. Carriles 1,7,8,9,14,16,17,18 y 19 muestras de pacientes en donde no se obtuvieron productos de amplificación. Carriles 3,10,11 y 12 productos de amplificación en muestras, no considerados debido a que el tamaño del producto no correspondía al tamaño buscado de 650 pb.

Gráfica 6. Detección de *Debaryomyces hansenii* en los participantes agrupados según el modo de alimentación a los 2 y 4 meses de vida. **LME** (Lactancia materna exclusiva) **LMM** (Lactancia materna mixta). Entre () expresados como porcentaje.

Valoración Antropométrica

Se evaluó el peso y talla de los lactantes al nacimiento, al segundo y cuarto mes de vida, mediante puntajes Z, con los indicadores de crecimiento de la Organización Mundial de la salud (OMS). Dos participantes con -3 Desviaciones estándar (DS) en peso para la talla, uno al nacimiento y el otro a los dos meses de vida, esta desviación indica emaciación severa, ambos participantes logran una recuperación de peso y talla hasta alcanzar normalidad a los 4 meses.

También se encuentra un participante dentro del grupo de lactancia materna mixta con -3 DS en peso para la edad interpretado como bajo peso y -3 DS en estatura para la edad que indica baja talla, al igual que los demás participantes logra alcanzar la mediana a los 4 meses de edad (**Tabla S2**).

Evaluación dietética de las madres lactantes.

Los resultados de la evaluación dietética materna pueden ser observados en la tabla 5, en ambos grupos los porcentajes de macronutrientes se encuentran dentro de los porcentajes recomendados por la NOM-043-SSA2-2012. La ingesta de colesterol y fibra es mayor en las madres que proporcionan lactancia materna exclusiva. En general se observa mayor consumo de micronutrientes en este último grupo a excepción de la niacina (Vitamina B3) que es mayor en el grupo de lactancia materna mixta. Se observa una menor ingesta diaria recomendada de la mayoría de los micronutrientes evaluados en el grupo de las madres que proporcionan lactancia materna mixta. Mientras que las vitaminas B1, B2, B12, y los minerales calcio y magnesio, son superados en los porcentajes de IDR en las madres con lactancia materna exclusiva. (Tabla 3)

Tabla 3. Análisis dietético de macronutrientes y micronutrientes de las madres participantes en el estudio.

Valores expresados como promedio, entre paréntesis () desviación estándar.

IDR: Ingesta diaria recomendada para mujeres lactantes edad 19-50 años censo 2000. En cuanto a él % de IDR, entre () el valor representa el porcentaje. En color verde vitaminas que modifican sus valores en leche humana, dependiendo de la ingesta materna.

Antropometría y Nutrición

Se realizó un mapa de correlación con el software RStudio versión 1.3.1093, agrupando las variables clínicas, antropométricas, y de crecimiento, más las variables obtenidas mediante la estimación de los principales nutrientes que pueden modificarse en la leche materna, a partir de la ingesta dietética de la madre calculadas con el software Nutrikcal (Figura 5).

Fig.5 Mapa de correlación entre variables antropométricas de la población de estudio y nutrientes de ingesta materna asociados a cambios en la leche materna. Mapa realizado con el software RStudio versión 1.3.1093

Las variables estimadas de la ingesta dietética de las madres, nos arroja una concordancia positiva entre los diferentes elementos, ya que los alimentos que ingieren están conformados por nutrientes muy diversos.

La variable IMC materno, es una proporción influenciada por muchas variables y su incremento por arriba de límites establecidos es utilizado para hacer el diagnóstico de

sobrepeso y obesidad, en nuestro estudio su incremento es asociado con una menor ingesta de vitamina B2.

La ingesta de proteína correlaciona con la diferencia de peso de los lactantes entre los tiempos 0 y 2 meses del nacimiento. La mayor ingesta de carbohidratos correlacionó con mayor peso y talla a los 2 pero no a los 4 meses. Mientras que la mayor ingesta de lípidos se correlacionó con una disminución en la aceleración de crecimiento en los primeros meses de vida extrauterina.

Interesantes hallazgos se encontraron cuando se compara la ganancia de peso del mes 2 al 4 con algunos hábitos alimenticios de la madre, en ese sentido, se encontró una correlación positiva con dicha ganancia de peso y el consumo de carbohidratos. Una marcada correlación negativa se encontró en esta diferencia de peso y el consumo de vitamina A y vitamina B6. Esta misma tendencia se encontró cuando se compara la ganancia de la talla de los lactantes y los parámetros anteriormente señalados.

Asociación de parámetros antropométricos y nutricionales con *C. albicans* y *D.hansenii*

Los datos comparativos de los participantes agrupados por la presencia o ausencia de *C. albicans* pueden ser observados en la **tabla S3** del material suplementario. Encontramos que el peso a los 4 meses y su diferencia al nacimiento presentan una significancia estadística ($p < 0.05$), en los lactantes con *C. albicans* positiva.

Se observan valores antropométricos ligeramente mayores en el grupo positivo a *C. albicans*. Así como menores cantidades de Vitamina A, C y mayor contenido de niacina. La ingesta materna de macronutrientes se encuentran acorde a las necesidades nutricionales en la etapa de lactancia en población mexicana de acuerdo a la NOM-043-SSA2-2012.

Los datos fueron trasladados a un mapa de calor para analizar a los lactantes en su conjunto, divididos por la forma de alimentación y la presencia o ausencia de *C. albicans* a los 2 meses de vida, (figura 6) y *D.hansenii* a los 2 y 4 meses de vida, (figura 7) Llama la atención como uno de los participantes, al tener una alimentación con lactancia mixta, tiene una correlación positiva con el resto de los parámetros con ausencia de *C. albicans*. mientras que los que los lactantes positivos a *C. albicans* tuvieron una tendencia a correlacionar negativamente con algunos de los nutrientes que pueden ser variables en la leche materna.

Los datos comparativos de los participantes a los 2 y 4 meses agrupados por la presencia o ausencia de *D.hansenii* pueden ser observados en la **tabla S4** del material suplementario.

Ningún valor tuvo una diferencia significativa; se observa menor ganancia de talla entre los participantes positivos. En cuanto a las características nutricionales de estos últimos se observa menor cantidad de lípidos, dentro de ellos, los de ácidos grasos mono y poliinsaturados. Mayor cantidad de fibra y vitaminas del complejo B. Y una disminución de vitamina A, C y niacina

Fig.6 Mapa de calor realizado en RStudio versión 1.3.1093 agrupado por la forma de alimentación y presencia o ausencia de *C. albicans*. Cada columna representa a un participante, los recuadros en color rojo intenso representan correlaciones negativas, y los recuadros azules correlaciones positivas.

Fig.7 Mapa de calor realizado en RStudio versión 1.3.1093 agrupado por la forma de alimentación y presencia o ausencia de *C. albicans*. Cada columna representa a un participante, los recuadros en color rojo intenso representan correlaciones negativas, y los recuadros azules correlaciones positivas.

DISCUSIÓN

El estudio de los hongos como parte de la microbiota humana ha tomado creciente interés, estudios como el proyecto de Microbioma humano se ha enfocado en el micobioma intestinal de individuos sanos, mediante secuenciación de ITS2, en el cual se ha encontrado que la diversidad fúngica fecal conformada principalmente por

levaduras es relativamente menor en comparación con la diversidad bacteriana (Nash *et al.*, 2017).

En el presente trabajo, se encontró que el 70% de los participantes tenían ADN fúngico detectable a los 2 meses de edad, este porcentaje se incrementó en un 100% a los 4 meses de vida, estas proporciones son coincidentes con las reportadas por Schei, *et al.*, 2017, en donde se muestrea una corte sana de madres e hijos, la detección de ADN fúngico en madres fue del 88% mientras que en los hijos fue de 76%, el ADN fúngico estaba presente en el primer muestreo a los 10 días de vida, incrementándose hasta los 2 años de edad. Esto destaca la colonización progresiva a través del tiempo (Schei *et al.*, 2017).

En nuestro estudio todos los participantes recibían leche materna, algunos de forma exclusiva y otros de forma complementaria, siendo este uno de los principales factores que contribuye al establecimiento de la microbiota intestinal durante los primeros meses de vida. Lo cual está en concordancia con un estudio de metagenómica, el cual sugiere que los hongos probablemente constituyen el 0,5-2% de la comunidad microbiana de la leche (Jiménez *et al.*, 2015). Se ha analizado la prevalencia de hongos en las diferentes etapas de la leche materna encontrando presencia en 16 de 18 muestras en calostro, 14 de 18 muestras en leche de transición y 28 de 29 en muestras de leche madura (Boix-Amorós *et al.*, 2017). Estos hallazgos sugieren que este complejo fluido puede actuar como una vía de colonización fúngica.

Con respecto al seguimiento de los hongos de interés en el tiempo de estudio, interesantes hallazgos nos muestran que, en ambos grupos, el porcentaje de detección de *Candida albicans* se ve disminuido al paso del tiempo, esto podría ser explicado por el contenido bacteriano presente en la leche materna, los cuales seguramente incrementarán las concentraciones de estos microorganismos en el intestino. Se sabe que géneros como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Collado *et al.*, 2009) incrementan exponencialmente su concentración a lo largo del tiempo. Con respecto al género *Lactobacillus*, se ha descrito la presencia de diversas especies, tales como: *Lactobacillus gasseri*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, y/o *L. fermentum* todas ellas pertenecientes a especies potencialmente probióticas (Martín *et al.*, 2004).

Existen diversos mecanismos reportados en la literatura por los cuales el género *Lactobacillus* puede antagonizar el crecimiento fúngico, en especial el de *C. albicans*. (Zeise *et al.*, 2021). *Lactobacillus rhamnosus* GG alberga moléculas ricas en galactosa, que forman parte de su superficie llamadas exopolisacáridos (EPS) estas contribuyen a su colonización estable en el tracto GI y, en consecuencia, mejoran su capacidad para antagonizar patógenos (Lebeer *et al.*, 2009).

Se ha encontrado que los EPS ricos en galactosa de *L. rhamnosus* GG bloquean la adhesión de *C. albicans* a varias líneas de células epiteliales (Allonsius *et al.*, 2017). Debido a que *C. albicans* tiene adhesinas similares a lectinas que pueden unirse a polisacáridos de superficie bacteriana como los EPS, los efectos antiadhesivos de *L. rhamnosus* GG probablemente se deban a la coagregación con *C. albicans* en lugar de la exclusión competitiva.

Los EPS de superficie ricos en galactosa constituyen, por tanto, uno de los mecanismos por los cuales las especies de *Lactobacillus* pueden antagonizar *C. albicans* en el tracto GI.

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en especial el butirato inhibe el crecimiento y la filamentación de *C. albicans*, pero también mejora la producción de óxido nítrico por los macrófagos y, por lo tanto, su capacidad para matar las células de *C. albicans* (Nguyen *et al.*, 2011).

L. rhamnosus GG secreta enzimas hidrolíticas como la proteína secretada peptidoglicano hidrolasa (Mspl), que tiene actividad quitinasa, lo que sugiere que usa quitina de la pared celular de *C. albicans* como sustrato para mejorar simultáneamente su propio crecimiento y bloquear la morfogénesis hifal de

C. albicans. Además, Mspl de *L. rhamnosus* GG funciona de manera óptima a pH ácido, lo que respalda el papel sinérgico del ácido láctico (Allonsius *et al.*, 2019).

Con respecto a la presencia de *Debaryomyces hansenii*, se ha reportado esta especie como parte de la microbiota en leche materna, en madres sanas, aunque en un bajo

porcentaje respecto a otras especies fúngicas (Boix-Amorós *et al.*, 2017). También se ha encontrado como una de las especies más abundantes de la microbiota intestinal de lactantes sanos durante el periodo de lactancia, en donde se propone a la leche materna como fuente de origen (Shei *et al.*, 2017).

Llama la atención que en nuestro estudio esta especie tuvo mayor porcentaje en los lactantes alimentados con lactancia mixta a los 2 y 4 meses.

En la evaluación de la ingesta dietética materna perteneciente a este grupo, encontramos mayor frecuencia en el consumo de lácteos y productos marinos. Se ha reportado la presencia de *D. hansenii* dentro del intestino de estos alimentos, lo que podría influir en la presencia de esta levadura (Angulo *et al.*, 2020).

D. hansenii podría ser un potencial colonizador intestinal, de la microbiota temprana. En un estudio realizado en células Caco-2, cepas de *D. hansenii* se adhirieron fuertemente, bajo condiciones extremas similares al tracto gastrointestinal, (Kourelis *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que algunas cepas crecen a 37°C. (Breuer *et al.*, 2006).

En años recientes se han estudiado los efectos probióticos de *D. hansenii* en animales terrestres y acuáticos. Sus principales efectos se deben a β -glucanos y a sus poliamidas. El suministro *D. hansenii* CBS 8339 en cabras recién nacidas durante 30 días mostrando una inmunidad mejorada a partir del día 15 (Angulo *et al.*, 2019).

En modelos murinos, se ha utilizado como tratamiento contra la diarrea inducida por antibióticos, observando aumentos en la taxonomía operativa unidades taxonómicas (OTU) de bacterias intestinales recuperando la densidad de población de ciertas especies de bacterias beneficiosas, como como *Bacteroidaceae* (He L *et al.*, 2017). En estudios de seguimiento se demuestra que *D. hansenii* en el intestino ayuda en el mantenimiento de ecología normal del microbioma, mejorando el crecimiento de bacterias productoras de lactasa (He Y *et al.*, 2019). Estudios *in vitro*, han mostrado su capacidad de inhibición del crecimiento de *Penicillium italicum*, por medio de la producción de enzimas hidrolíticas (β -1,3 glucanasa, quitinasa y proteasa) y en poscosecha controla la podredumbre azul (causada por *P. italicum*) en frutos de limón mexicano (Hernández *et al.*, 2012).

Estos hallazgos sugieren que *D. hansenii* podría conferir beneficios inmunológicos y protectores en el huésped humano.

Otro de los factores fundamentales en el establecimiento de la microbiota intestinal es el modo de nacimiento, los bebés nacidos por vía cesárea tienen un microbioma dominado por *Corynebacterium*, *Staphylococcus* y *Propionibacterium* spp. Que derivan de la piel de la madre y el entorno hospitalario (Biasucci *et al.*, 2010), mientras que los nacidos por vía vaginal muestran un enriquecimiento de *Bifidobacterium* spp. y una reducción de *Enterococcus* y *Klebsiella* spp.

Una de las principales diferencias entre los dos modos de entrega es la transmisión vertical. El 72% de las bacterias que colonizan el intestino de los bebés nacidos por vía vaginal estaban presentes en el microbioma fecal de su madre, en comparación con solo el 41% de los bebés nacidos por vía cesárea (Bäckhed *et al.*, 2015).

Encontramos mayor detección de ADN fúngico en los nacidos por vía cesárea, esta comparación se realizó a los 2 meses de edad, debido a inconvenientes en el procesamiento de la muestra obtenida al nacimiento. En contraste con un estudio en donde la producción de ADN fúngico fue menor en los lactantes nacidos por cesárea en comparación con los lactantes nacidos por vía vaginal, realizándose en varios cortes de tiempo, estas diferencias no se encontraron al año de vida y a la introducción de alimentos sólidos (Wampach *et al.*, 2017).

Llama la atención el porcentaje elevado de cesáreas, estos resultados son coincidentes en lo reportado por la encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT 2018) en donde se observó que las instituciones privadas atendieron partos por cesárea en un 74.4%, respecto a ISSSTE/ISSSTE Estatal 60.8% e IMSS/IMSS Prospera 48.9%. Destaca que tanto en las instituciones privadas como en el ISSSTE/ISSSTE Estatal fue mayor la proporción de mujeres que reportaron cesáreas programadas, en cambio en el IMSS/ IMSS Prospera se da la situación contraria. Se hace mención de la importancia de efectuar una revisión exhaustiva del diagnóstico

pre quirúrgico para la realización de las cesáreas y evitar con ello cesáreas innecesarias. Esta práctica a su vez limita la adquisición de una microbiota benéfica.

Entre nuestros participantes el porcentaje de *Candida albicans* es mayor en los nacidos por vía vaginal, esta especie se encuentra formando parte de la micobiota vaginal, en un estudio basado en análisis de huella génica y cultivo, mujeres asintomáticas sin antecedentes de candidiasis vaginal fueron muestreadas (n=52), el 40% portaban al menos un aislamiento de *Candida spp*, de los cuales el 90% eran *C. albicans* en sus tractos genitales, vulva o vagina (Soll *et al.*, 1991). Al analizar micobiotas cutáneas de bebés nacidos por vía vaginal se observó que contienen una abundancia relativa más alta de *C. albicans* que la de los bebés nacidos por cesárea a los 30 días de vida (Warld *et al.*, 2018).

En bebés de muy bajo peso al nacer (n=46), el 24% fue colonizado en un mismo sitio (cavidad oral, recto o ingle) con *C. albicans* dentro de la semana posterior al nacimiento por el mismo aislado de *C. albicans* presentes en el vagina, recto, piel o boca de la madre, esto fue determinado por análisis de huella génica.

Probablemente *C. albicans* presente en la micobiota materna juegue un papel importante en los eventos de colonización de los bebés nacidos por vía vaginal.

Un parto por cesárea limita la colonización temprana y la transmisión vertical.

A la agrupación de los participantes por su ubicación, detectamos mayor ADN fúngico en las zonas urbanas, aunque estos resultados podrían estar sesgados por los pocos participantes que habitan en zonas de terracería; Sin embargo, la geografía ha sido propuesta como uno de los factores que podrían contribuir al desarrollo de la micobiota intestinal. La ubicación geográfica puede estar asociada con diferentes factores ambientales, como el clima, que puede provocar cambios estructurales en la micobiota, hallazgos previos han demostrado que los hongos tienen patrones biogeográficos dependientes del clima (Wang *et al.*, 2018). Es probable que estos patrones determinen el tipo de hongos a los que pueden estar expuestos los

individuos, lo que a su vez puede afectar la colonización de hongos en el intestino humano.

Con respecto al perfil nutricional de las madres, en este trabajo se encontró que las madres que proporcionan lactancia materna exclusiva, se encuentran con un diagnóstico de sobrepeso (IMC > 25) mientras que las madres que proporcionan lactancia mixta se agrupan dentro de los parámetros de obesidad (IMC > 30), según la escala de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Al análisis dietético en este último grupo se consume mayor cantidad de alimentos industrializados, esto se refleja en la disminución de micronutrientes.

El gasto energético basal de las mujeres en etapa de lactancia se ve modificado por múltiples factores entre los que destacan edad, composición corporal, sueño, hormonas, estado de salud y por supuesto el gasto incrementado por la producción de leche, en nuestro estudio las madres que proporcionaban lactancia materna exclusiva parecen consumir cantidades más altas de macro y micronutrientes respecto a las madres que proporcionan lactancia materna mixta.

El Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría señala que el estado nutricional de la madre no modifica significativamente la composición de la leche materna; Sin embargo algunos nutrientes como las vitaminas A, C y complejo B, así como ácidos grasos influyen en la composición de la leche dependiendo de la ingesta materna (Samuel *et al.*, 2020), es por ello que correlacionamos estos factores a la presencia de *C. albicans* y *D. hansenii*, así como a factores antropométricos de la madre y del lactante.

Observamos una correlación negativa entre la ingesta de B2 e IMC materno, en un estudio donde se realizó una asociación entre la ingesta dietética de vitamina B y la obesidad en una gran población pediátrica, concluyó que la riboflavina no tuvo una asociación significativa con el peso (Taleban *et al.*, 2019)

Los participantes con ambas levaduras presentes, se encuentran con una correlación negativa de vitamina C y A.

En estudios *in vitro* se ha observado que a distintas concentraciones el ácido ascórbico detiene el crecimiento celular, reduce la secreción de proteínasa y aumenta la citotoxicidad celular de *C. albicans*. Además de proporcionar un medio ácido que favorece la presencia de *Lactobacillus* (Ojha *et al.*,2009) de los cuales ya hemos revisado su papel antagónico.

La vitamina A es un nutriente esencial que se obtiene a través de la dieta, ya sea como provitamina-A (carotenoides) o como vitamina A preformada (retinol). En su forma esterificada, se puede almacenar en el hígado, donde se hidroliza continuamente a retinol y se distribuye a la circulación. Una vez en los tejidos diana, dos deshidrogenasas pueden convertir el retinol en ácido retinoico, el metabolito biológicamente activo de la vitamina A, que se ha estudiado como inmunomodulador (D'Ambrosio *et al.*,2011). Se ha encontrado que uno de sus isómeros el ácido transretinoico, presenta actividad fungistática sobre *A. fumigatus* y *C. albicans* (Campioni *et al.*,2016).

La microbiota intestinal produce cientos de compuestos bioactivos, incluidas las vitaminas B, que desempeñan papeles fisiológicos significativos en los huéspedes al apoyar la aptitud de las especies simbióticas y la supresión del crecimiento de especies competitivas. A excepción de la niacina (vitamina B3), un huésped mamífero no puede producir vitaminas B de novo; existe una estricta dependencia de un suministro exógeno, de la dieta y de la microbiota (Uebanso *et al.*, 2020).

El aporte de vitamina B será diferente dependiendo de la composición de la microbiota intestinal. En nuestro estudio existe una correlación negativa entre las levaduras y algunas vitaminas del complejo B, que podría ser explicado por la competencia microbiana dentro del intestino.

Hasta la fecha, todos los prebióticos conocidos son compuestos de carbohidratos, principalmente oligosacáridos, que resisten la digestión en el intestino delgado humano y llegan al colon, donde son fermentados por la microflora intestinal. Los estudios han proporcionado evidencia de que la inulina y la oligofruktosa (OF), la lactulosa y el

almidón resistente (RS) cumplen con todos los aspectos de la definición, incluida la estimulación de *Bifidobacterium*, un género bacteriano beneficioso. Otros carbohidratos aislados y alimentos que contienen carbohidratos, incluidos los galactooligosacáridos (GOS), los transgalactooligosacáridos (TOS), la polidextrosa, la dextrina de trigo, la goma arábica, el psyllium, el plátano, el trigo integral y el maíz integral también tienen efectos prebióticos (Gibson *et al.*, 2004). En ese sentido, en el presente trabajo se observó una correlación positiva entre la ingesta de fibra y la detección positiva de *D. hansenii*. Considerando a *D. hansenii* como una especie potencialmente probiótica, el efecto de la fibra como componente prebiótico (ingrediente fermentado selectivamente que permite cambios específicos, tanto en la composición como en la actividad de la microbiota gastrointestinal, que confieren beneficios al huésped) (Gibson *et al.*, 2004) podría estar favoreciendo su crecimiento.

CONCLUSIONES

Se presentan los resultados del primer estudio en pacientes pediátricos con el objeto de evaluar la microbiota intestinal. Este trabajo se considera un estudio piloto, dado que es un acercamiento al conocimiento de dos de las principales especies colonizadoras fúngicas en recién nacidos sanos mexicanos, observamos un incremento en la colonización fúngica intestinal a través del tiempo; sin embargo, su establecimiento puede estar limitado por mecanismos bacterianos y nutricionales presentes en el huésped.

Esto abre la brecha para explorar la microbiota intestinal en México, aprovechando su diversidad climática que puede influir en los perfiles fúngicos, un estudio con mayor número de lactantes y un seguimiento a lo largo del tiempo, con uso de técnicas moleculares, como la secuenciación masiva, podrían aportar conocimiento más amplio de la microbiota intestinal y de su influencia en el crecimiento, desarrollo y salud del lactante.

BIBLIOGRAFÍA

- Allonsius, C. N., van den Broek, M., De Boeck, I., Kiekens, S., Oerlemans, E., Kiekens, F., Foubert, K., Vandenheuvel, D., Cos, P., Delputte, P., & Lebeer, S. (2017). Interplay between *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Candida* and the involvement of exopolysaccharides. *Microbial biotechnology*, 10(6), 1753–1763. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12799>
- Allonsius, C. N., Vandenheuvel, D., Oerlemans, E., Petrova, M. I., Donders, G., Cos, P., Delputte, P., & Lebeer, S. (2019). Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Scientific reports*, 9(1), 2900. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39625-0>
- Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Cepeda-Palacios, R., Tovar-Ramírez, D., Esteban, M. Á., & Angulo, C. (2019). Probiotic effects of marine *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 on innate immune and antioxidant parameters in newborn goats. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(5), 2339–2352. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09621-5>
- Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Medina-Córdova, N., Tovar-Ramírez, D., & Angulo, C. (2020). Probiotic and nutritional effects of *Debaryomyces hansenii* on animals. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(18), 7689–7699. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10780-z>
- Arrieta, M. C., Arévalo, A., Stiemsma, L., Dimitriu, P., Chico, M. E., Loor, S., Vaca, M., Boutin, R., Morien, E., Jin, M., Turvey, S. E., Walter, J., Parfrey, L. W., Cooper, P. J., & Finlay, B. (2018). Associations between infant fungal and bacterial dysbiosis and childhood atopic wheeze in a nonindustrialized setting. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 142(2), 424–434.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.041>
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., Tremaroli, V., & Wang, J. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year

- of Life. *Cell host & microbe*, 17(5), 690–703.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Ballan, R., Battistini, C., Xavier-Santos, D., & Saad, S. (2020). Interactions of probiotics and prebiotics with the gut microbiota. *Progress in molecular biology and translational science*, 171, 265–300.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.03.008>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric clinics of North America*, 60(1), 49–74.
<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Bates, S. T., Ahrendt, S., Bik, H. M., Bruns, T. D., Caporaso, J. G., Cole, J., Dwan, M., Fierer, N., Gu, D., Houston, S., Knight, R., Leff, J., Lewis, C., Maestre, J. P., McDonald, D., Nilsson, R. H., Porras-Alfaro, A., Robert, V., Schoch, C., Scott, J., & Stajich, J. E. (2013). Meeting report: fungal its workshop (october 2012). *Standards in genomic sciences*, 8(1), 118–123.
<https://doi.org/10.4056/sigs.3737409>
- Biasucci, G., Rubini, M., Riboni, S., Morelli, L., Bessi, E., & Retetangos, C. (2010). Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early human development*, 86 Suppl 1, 13–15.
<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004>
- Blackwell M., (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American journal of botany*, 98(3), 426–438. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>
- Bliss, J. M., Basavegowda, K. P., Watson, W. J., Sheikh, A. U., & Ryan, R. M. (2008). Vertical and horizontal transmission of *Candida albicans* in very low birth weight infants using DNA fingerprinting techniques. *The Pediatric infectious disease journal*, 27(3), 231–235. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31815bb69d>
- Boix-Amorós, A., Martínez-Costa, C., Querol, A., Collado, M. C., & Mira, A. (2017). Multiple Approaches Detect the Presence of Fungi in Human Breastmilk Samples from Healthy Mothers. *Scientific reports*, 7(1), 13016.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13270-x>

- Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast Chichester, England*, 23(6), 415–437. <https://doi.org/10.1002/yea.1374>
- Bryan, C. A. O., Pak, D., Crandall, P. G., Lee, S. O., & Ricke, S. C. (2013). The Role of Prebiotics and Probiotics in Human Health. *Journal of Probiotics & Health*, 01(02). <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000108>
- Campione, E., Gaziano, R., Marino, D., & Orlandi, A. (2016). Fungistatic activity of all-trans retinoic acid against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Drug design, development and therapy*, 10, 1551–1555. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S93985>
- Cavalcanti Neto, M. P., Aquino, J. de S., Romão da Silva, L. de F., de Oliveira Silva, R., Guimarães, K. S. de L., de Oliveira, Y., de Souza, E. L., Magnani, M., Vidal, H., & de Brito Alves, J. L. (2018). Gut microbiota and probiotics intervention: A potential therapeutic target for management of cardiometabolic disorders and chronic kidney disease? In *Pharmacological Research* (Vol. 130, pp. 152–163). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.020>
- Collado, M. C., Delgado, S., Maldonado, A., & Rodríguez, J. M. (2009). Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in applied microbiology*, 48(5), 523–528. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02567.x>
- D'Ambrosio, D. N., Clugston, R. D., & Blaner, W. S. (2011). Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients*, 3(1), 63–103. <https://doi.org/10.3390/nu3010063>
- Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN. (2020). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca). 25 enero 2022, de Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN. Sitio web: <https://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>

- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., & Louis, P. (2015). Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 74(1), 13–22. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001463>
- Fujimura, K. E., Sitarik, A. R., Havstad, S., Lin, D. L., Levan, S., Fadrosch, D., Panzer, A. R., LaMere, B., Rackaityte, E., Lukacs, N. W., Wegienka, G., Boushey, H. A., Ownby, D. R., Zoratti, E. M., Levin, A. M., Johnson, C. C., & Lynch, S. V. (2016). Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. *Nature medicine*, 22(10), 1187–1191. <https://doi.org/10.1038/nm.4176>
- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G. T., & De Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: The impact of probiotics. *Genes and Nutrition*, 6(3), 209–240. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0229-7>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition research reviews*, 17(2), 259–275. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>
- Hallen-Adams, H. E., & Suhr, M. J. (2017). Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*, 8(3), 352–358. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1247140>
- Hamad, I., Raoult, D., & Bittar, F. (2016). Repertory of eukaryotes (eukaryome) in the human gastrointestinal tract: taxonomy and detection methods. *Parasite immunology*, 38(1), 12–36. <https://doi.org/10.1111/pim.12284>
- He L., Long C, Liu Y, Guo Y, Xiao N, & Tan Z. (2017). Effects of *Debaryomyces hansenii* treatment on intestinal microorganisms in mice with antibiotics-induced diarrhea. *3 Biotech* 7:347. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0953-9>

- He Y., Tang Y, Peng M, Xie G, Li W, & Tan Z. (2019). Influence of *Debaryomyces hansenii* on bacterial lactase gene diversity in intestinal mucosa of mice with antibiotic-associated diarrhea. *PLoS One* 14(12): e0225802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225802>
- Hernández-Montiel., R.J. Holguín-Peña, C.P. Larralde-Corona, R. Zulueta-Rodríguez, E. Rueda-Puente & M. Moreno-Legorreta. (2012). Effect of inoculum size of yeast *Debaryomyces hansenii* to control *Penicillium italicum* on Mexican lime (*Citrus aurantiifolia*) during storage, *CyTA - Journal of Food*, 10:3, 235-242, DOI: [10.1080/19476337.2011.633350](https://doi.org/10.1080/19476337.2011.633350)
- Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336(6086), 1268–1273. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>
- Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336(6086), 1268–1273. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>
- Kabwe, M. H., Vikram, S., Mulaudzi, K., Jansson, J. K., & Makhalanyane, T. P. (2020). The gut mycobiota of rural and urban individuals is shaped by geography. *BMC microbiology*, 20(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01907-3>
- Kourelis A., Kotzamanidis C, Litopoulou-Tzanetaki E, Scouras ZG, Tzanetakis N, & Yiangou M. (2010). Preliminary probiotic selection of dairy and human yeast strains. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 13: 93 – 104, 2010
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrêne, Y., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2009). Identification of a Gene Cluster for the Biosynthesis of a Long, Galactose-Rich Exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and Functional Analysis of the Priming Glycosyltransferase. *Applied and environmental microbiology*, 75(11), 3554–3563. <https://doi.org/10.1128/AEM.02919-08>
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Olivares, M., & Rodríguez, J. M. (2004). The commensal microflora of human milk: new

- perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3-4), 121–127. <https://doi: 10.1016/j.tifs.2003.09.010>
- Moré, M. I., & Swidsinski, A. (2015). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis - a review. *Clinical and experimental gastroenterology*, 8, 237–255. <https://doi.org/10.2147/CEG.S85574>
- Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7(3), 189–200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
- Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., Stewart, C. J., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2017). The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*, 5(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>
- Nguyen, L. N., Lopes, L. C., Cordero, R. J., & Nosanchuk, J. D. (2011). Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(11), 2573–2580. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr358>
- Ojha, R., & Manzoor, Nikhat & Khan, L. (2009). Ascorbic acid modulates pathogenicity markers of *Candida albicans*. *International journal of Microbiology Research*, 1, 19-24. <https://10.9735/0975-5276.1.1.19-24>
- Oliphant, K., & Allen-Vercoe, E. (2019). Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: Major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>
- Otakar Rop., Jiri Mlcek, & Tunde Jurikova. (2009). Beta-glucans in higher fungi and their health effects, *Nutrition Reviews*, Volume 67, Issue 11, Pages 624–631, <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00230.x>
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes & nutrition*, 6(3), 285–306.

<https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>

- Rodríguez JM., Murphy K, & Stanton C *et al.* (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial ecology in health and disease* 26:26050. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>
- Samuel, T. M., Zhou, Q., Giuffrida, F., Munblit, D., Verhasselt, V., & Thakkar, S. K. (2020). Nutritional and Non-nutritional Composition of Human Milk Is Modulated by Maternal, Infant, and Methodological Factors. *Frontiers in nutrition*, 7, 576133. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.576133>
- Scanlan, P., & Marchesi, J. (2008). Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 2, 1183–1193. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.76>
- Schei, K., Avershina, E., Øien, T., Rudi, K., Follestad, T., Salamati, S., & Ødegård, R. A. (2017). Early gut mycobiota and mother-offspring transfer. *Microbiome*, 5(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0319-x>
- Selma-Royo, M., Tarrazó, M., García-Mantrana, I., Gómez-Gallego, C., Salminen, S., & Collado, M. C. (2019). Shaping Microbiota During the First 1000 Days of Life. *Advances in experimental medicine and biology*, 1125, 3–24. https://doi.org/10.1007/5584_2018_312
- Strati, F., Di Paola, M., Stefanini, I., Albanese, D., Rizzetto, L., Lionetti, P., Calabrò, A., Jousson, O., Donati, C., Cavalieri, D., & De Filippo, C. (2016). Age and Gender Affect the Composition of Fungal Population of the Human Gastrointestinal Tract. *Frontiers in microbiology*, 7, 1227. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01227>
- Taleban, R., Heidari-Beni, M., Qorbani, M., Esmail Motlagh, M., Fazel-Tabar Malekshah, A., Moafi, M., Hani-Tabaei Zavareh, N., & Kelishadi, R. (2019). Is dietary vitamin B intake associated with weight disorders in children and adolescents? The weight disorders survey of the CASPIAN-IV Study. *Health promotion perspectives*, 9(4), 299–306. <https://doi.org/10.15171/hpp.2019.41>

- Uebanso, T., Shimohata, T., Mawatari, K., & Takahashi, A. (2020). Functional Roles of B-Vitamins in the Gut and Gut Microbiome. *Molecular nutrition & food research*, 64(18), e2000426. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000426>
- Wampach, L., Heintz-Buschart, A., Hogan, A., Muller, E., Narayanasamy, S., Laczny, C. C., Hugerth, L. W., Bindl, L., Bottu, J., Andersson, A. F., de Beaufort, C., & Wilmes, P. (2017). Colonization and Succession within the Human Gut Microbiome by Archaea, Bacteria, and Microeukaryotes during the First Year of Life. *Frontiers in microbiology*, 8, 738. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00738>
- Wang D, Rui Y, Ding K, Cui X, Hao Y, Tang L, Pang Z, Zhang B, Zhou S, & Wang K. (2018). Precipitation drives the biogeographic distribution of soil fungal community in inner Mongolian temperate grasslands. *Journal of soils and Sediments*.18(1):222–228. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1727-z>
- Ward, T. L., Knights, D., & Gale, C. A. (2017). Infant fungal communities: current knowledge and research opportunities. *BMC medicine*, 15(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0802-z>
- World, T. L., Dominguez-Bello, M. G., Heisel, T., Al-Ghalith, G., Knights, D., & Gale, C. A. (2018). Development of the Human Mycobiome over the First Month of Life and across Body Sites. *mSystems*, 3(3), e00140-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00140-17>
- Wasilewski, A., Zielińska, M., Storr, M., & Fichna, J. (2015). Beneficial effects of probiotics, prebiotics, synbiotics, and psychobiotics in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(7), 1674–1682. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000364>
- Zeise, K. D., Woods, R. J., & Huffnagle, G. B. (2021). Interplay between *Candida albicans* and Lactic Acid Bacteria in the Gastrointestinal Tract: Impact on Colonization Resistance, Microbial Carriage, Opportunistic Infection, and Host Immunity. *Clinical microbiology reviews*, 34(4), e0032320. <https://doi.org/10.1128/CMR.00323-20>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Valores de concentración y pureza de las muestras de ADN.

Tabla S2. Puntajes Z (OMS) con los principales indicadores de peso, talla y edad de los participantes en 3 cortes de tiempo.

# participante	Datos del lactante Puntaje Z al nacimiento			Datos del lactante Puntaje Z a los 2 meses			Datos del lactante Puntaje Z a los 4 meses		
	Z peso para la talla	Z peso para la edad	Z estatura para la edad	Z peso para la talla	Z peso para la edad	Z estatura para la edad	Z peso para la talla	Z peso para la edad	Z estatura para la edad
1	0.13	-0.29	-0.35	-3.35	-2.28	-0.04	-1.66	-1.26	-0.05
4	-0.75	-0.89	-0.47	0.61	-0.25	-0.72	1.82	-0.01	-1.88
5	-0.07	-0.89	-1	0.02	0.6	0.78	0.78	1.73	1.97
9	-1.15	-0.87	-0.08	0.08	-0.43	-0.53	0.94	-0.04	-1
10	-0.51	0.82	1.53	0.49	0.67	0.45	2.75	2.06	-0.05
2	-1.78	-1.1	-1.52	-0.83	-3.54	-3.22	0.02	-1.35	-1.88
6	-0.66	1.18	2.07	0.68	0.81	0.45	2.62	2.25	0.41
7	-0.23	0.55	0.99	-1.63	-1.17	-0.04	-2.53	-1.56	0.41
8	-3.11	-2.15	-0.47	-0.85	-1.69	-1.22	-1.03	-1.35	-0.91
3	0.77	-0.58	-1.26	-0.26	-0.4	-0.22	-1.15	-0.8	0.05

	Mediana
	,+ O - , 2 SD
	,+ O - , 3 SD

Tabla S3. Datos antropométricos y nutricionales agrupados por la presencia o ausencia de *C. albicans*.

Los parámetros subrayados resaltan las principales diferencias entre ambos grupos. [] valor mínimo y máximo. () Desviación estándar.

Tabla S4 Datos antropométricos y nutricionales agrupados por la presencia o ausencia de *D. hansenii* celdas en color amarillo señalan las principales diferencias.

Los parámetros subrayados resaltan las principales diferencias entre ambos grupos. [] valor mínimo y máximo. () Desviación estándar.

ANEXOS

Anexo 1 Hoja inicial de recolección de datos, esta hoja estaba integrada con el consentimiento informado.

HISTORIA CLÍNICO-NUTRICIONAL

DATOS DE LA MADRE

Nombre:

Fecha de nacimiento:

Edad:

Modo de parto:

Peso Pregestacional: _____ Kg	Peso Actual: _____ kg
Talla: _____ mt.	

¿Realizó actividad física durante el embarazo?

¿Recibió información sobre los beneficios de la lactancia materna?

¿Tuvo complicaciones para el establecimiento de la lactancia materna?

Antecedentes patológicos

Medicamentos o suplementos utilizados durante el último trimestre:

Medicamentos o suplementos actuales (probióticos y prebióticos):

DATOS DEL LACTANTE

Nombre:

Sexo: (M) (F)

Fecha de nacimiento:

Semanas de gestación:

Peso al nacimiento: _____ kg
Talla al nacimiento: _____ cm.
Perímetro cefálico: _____ cm

Complicaciones durante el nacimiento:

si no Especifique: _____

¿Tuvo problemas de agarre al seno materno?

¿Tiene succión adecuada?

Medicamentos Actuales:

Notas:

INFORMACIÓN DEL CONTACTO

Nombre:

Dirección:

Teléfono:

Anexo 2 Cuestionario de seguimiento, aplicado en la visita domiciliaria.

Participante:

Fecha de recolección de datos: _____

Edad del bebe:

Peso: Talla:

Actualmente la alimentación de su bebe es:

- Lactancia Materna
 Fórmula infantil ¿Cuántas onzas recibe al día? _____
 Lactancia y fórmula infantil ¿Cuántas onzas recibe al día? _____

CONDICIONES AMBIENTALES

¿Vive en una zona pavimentada?

¿Cuenta con servicios básicos?

Luz

Agua

Drenaje

¿Tiene animales domésticos?

¿Tiene animales de granja?

¿Existe una industria cerca de su vivienda?

¿El bebe acude a una estancia infantil?

En caso de que su bebe reciba alimentación por lactancia materna o Lactancia materna con fórmula infantil, sea tan amable de llenar el siguiente formulario:

RECORDATORIO DE 24 HORAS

Alimento consumido por la madre en 24 horas, indica porciones por ejemplo: Taquitos de huevo
2 tortillas de maíz, 1 huevo, 1 cucharadita de aceite.

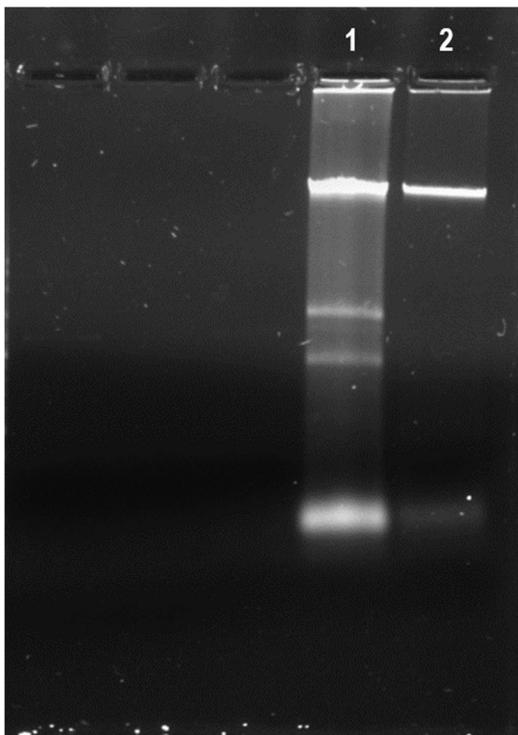
ALIMENTO	BEBIDA
DESAYUNO	
COLACIÓN MATUTINA	
COMIDA	
COLACIÓN VESPERTINA	
CENA	

Anexo 3

Método fenol cloroformo, para la extracción de ADN en heces fecales.

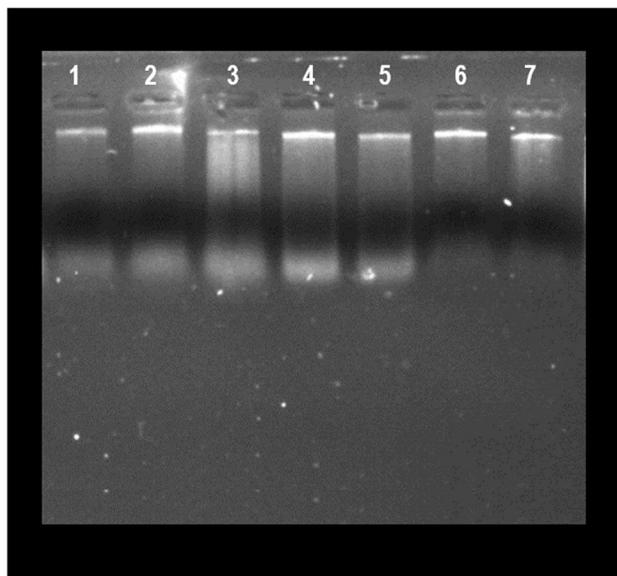
1. Alicuotar las muestras 125 mg de materia fecal
2. Añadir 200 μ L de buffer de fosfatos (pH 7)
3. Añadir 200 μ L de buffer de Lisis con SDS al 4%
4. Agregar 40 mg de perlas de vidrio, glass beads unwashed $\leq 106 \mu$ m.
4. Vortex por 10s, agitación suave (Poner los tubos acostados y pegados al vortex).
5. Reposar en hielo 10 min
6. Vortex por 10s, agitación suave
7. Reposar en hielo 10 min
8. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min
9. Extraer el sobrenadante
10. Añadir fenol-cloroformo 1:1
11. Mezclar en vortex durante 30s
12. Dejar reposar 10 min
13. Centrifugar a 13,000 rpm por 6 min
14. Extraer el sobrenadante, (Tener cuidado, de no extraer la interface)
15. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, y añadir cloroformo 1:1
16. Dejar reposar 10 min
17. Centrifugar a 13,000 rpm por 6 min
18. Extraer el sobrenadante
19. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y añadir 1 volumen de isopropanol frío y acetato de sodio pH 4.8 (1:10)
20. Agita de manera manual
21. Dejar reposar en Isopropanol, a -20°C durante 24h
22. Centrifugar en frío 4°C a 13,000 rpm durante 10 min
23. Decantar
24. Lavar el pellet (ácidos nucleicos) con 500 μ L de etanol al 70% frío
25. Reposar 10 min y volver a centrifugar 13,000 rpm por 3 min
26. Para obtener mayor pureza realizar 2 lavados con etanol
27. Eliminar el sobrenadante
28. Secar en partilla termoblock a 50°C
29. Re suspender los ácidos nucleicos en 50 μ L de agua estéril, según la cantidad del pellet.
30. Etiquetar y almacenar las muestras a -60°C .

Anexo 3



Integridad del ADN en gel de agarosa al 1%

Carril 1 Extracción con metodología sin perlas de vidrio ni ARNasa. Carril 2 Extracción con la metodología seleccionada.



Integridad de ADN en las muestras P:

Participante, el número seguido del guion indica los meses de los participantes. Carril 1 P10-4, carril 2 P10-2, carril 3 muestra descartada, carril 4 P7-4, carril 5 P7-2, Carril 6 P2-2, carril 7 P2-4.

Anexo 4

Procedimiento para Electroforesis en agarosa de ácidos nucleicos

1. Medir el volumen de buffer de electroforesis 1x a utilizar (TAE o TBE), este dependerá del grosor y dimensiones del casete de electroforesis a utilizar.
2. Calcular la concentración de agarosa a utilizar, 1% para la evaluación de la integridad del ADN genómico, 2 % Tamizaje genético de fragmentos de PCR pequeños.
3. Pesar la agarosa y disolver en un matraz junto con el buffer.
4. Colocar el matraz en el horno microondas y calentar durante 1 o 2 min, evitando en lo posible la ebullición de la agarosa.
5. Retirar el matraz del horno microondas con guante de protección térmica y esperar hasta que disminuya su temperatura a 50°C.
6. Agregar la cantidad correspondiente de Bromuro de Etidio al gel de agarosa (a razón de 5 µL de Bromuro de Etidio por cada 100 mL del gel) Mezclar.
7. Dejar enfriar durante 3 min.
8. Sellar el contenido del casete de electroforesis con los sellos de acrílico. Y colocar el peine.
9. Vaciar el contenido al casete.
10. Dejar cuajar por completo durante al menos 30 min protegiéndolo de corrientes de aire directas, evitar el uso de toallas de papel cerca de los geles de agarosa para evitar contaminarlo.
11. Después de los 30 min, retirar los sellos del casete y cuidadosamente el peine para evitar romper los pocillos.
12. Colocar dentro del tanque de electroforesis. Verter la cantidad apropiada de buffer de electroforesis (del mismo tipo empleado para preparar el gel). El buffer solamente deberá cubrir discretamente (no más de 1 mm de altura) a los pocillos del gel).
13. Cargar el gel con producto de PCR o ácido nucleico tomando en cuenta el volumen máximo recomendado para cada peine.