



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Identificación de miRNAs inmunorreguladores en leche materna

Tesis de Maestría que presenta

Juan Manuel Vélez Ixta

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis

Dr. Jaime García Mena

Ciudad de México

Julio del año 2021

COMITÉ TUTORAL

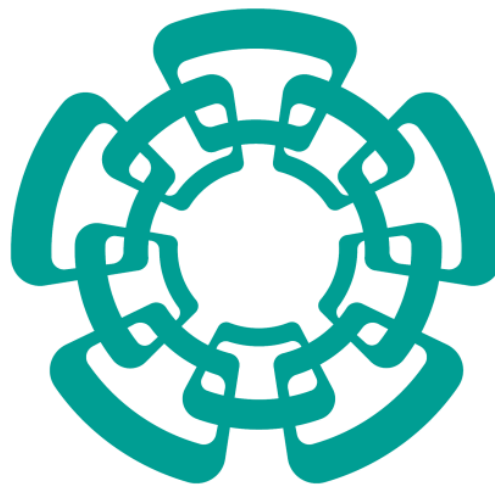
ASESORES

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

ASESOR EXTERNO AL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLEULAR

Dr. Fanis Missirlis
Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

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



Cinvestav

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

Agradecimientos Académicos y Financiamiento

Se agradece a los miembros de mi Comité Tutorial, Dr. Jaime García Mena por su dedicación en el trabajo y sus alumnos, por sus consejos y asesoría en el proyecto y en mi formación académica. Dr. Efraín Garrido Guerrero, por su asesoría en este trabajo, además de sus enseñanzas como maestro en los cursos de Genética. Dr. Fanis Missirlis, por sus educadas y muy útiles observaciones en este trabajo que sin duda contribuyeron a mejorar la calidad del mismo.

Se agradece el apoyo del Biól. Alberto Piña Escobedo como asistente técnico del laboratorio y su apoyo de reactivos y al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia en el mantenimiento del material e instalaciones de laboratorio. Se le agradece a Tizziani Benítez Guerrero por su arduo apoyo y asesoramiento con las diversas metodologías realizadas durante este trabajo, por su auténtica dedicación y sus estrictas observaciones. También a mis compañeras Karina Corona Cervantes y Norma Gabriela Zavala Torres, además del equipo de trabajo del Laboratorio por su apoyo y revisión del trabajo, a Arlene Aguilera Hernández, que aunque no conocí, me precedió en este trabajo.

El trabajo se llevó a cabo gracias al financiamiento del Cinvestav, del Fondo SEP-Cinvestav-2018-174 y del Proyecto CF2019-6669, FORDECYT-PRONACES/6669/2020.

Juan Manuel Vélez Ixta (CVU 997152), fue becario de Maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante el periodo de Septiembre de 2019 a Agosto de 2021 (997152).

Agradecimientos Personales

Agradezco, por supuesto, a mis padres Juan Carlos y Raquel, que fueron el primer pilar en mi educación y desarrollo y que han dedicado su vida a sus hijos, logrando un gran trabajo con cada uno de los tres; también reconozco el esfuerzo de mis hermanos, con quienes he compartido diferentes puntos de vista y experiencias. A mis abuelos que me brindaron alojamiento y apoyo cuando tomé la decisión realizar mis estudios lejos de casa. A mis tíos, por todos esos consejos que me dieron y a mis primos por los buenos momentos.

Agradezco a mis compañeros de Maestría y a mis amigos, los antiguos y los nuevos. Destaco a Diana Laura con quien compartí muchas ideas a lo largo de este periodo que consistió la Maestría, a Luz con quien pasé buenos momentos y a Jorge Arturo, que a pesar de que ya no nos acompaña, fue un buen amigo durante el breve tiempo que lo conocí.

Agradezco por último a todos aquellos que llegaron antes de mí y decidieron compartir su conocimiento con el mundo a través de la ciencia, la divulgación o la enseñanza, anónimos o no. A los autores detrás de los textos que me acompañaron a través del ocio, el trabajo y el estudio; también a los miembros de foros de preguntas, a los escritores de manuales y documentaciones que de manera indirecta contribuyeron al desarrollo de este trabajo y mi aprendizaje; a los maestros del sistema de educación que a lo largo de cada una de mis etapas trabajaron en mi formación y la de muchos otros profesionales.

Índice

Agradecimientos	1
Resumen	4
Introducción	1
Antecedentes.....	6
Justificación	8
Alcance.....	9
Hipótesis.....	9
Objetivo general	9
Metodología.....	11
Muestra	11
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	11
Diseño de oligos.....	12
Extracción de RNA	12
Síntesis de cDNA	14
Cuantificación de miRNAs.....	15
Análisis bioinformático y estadístico	17
Resultados.....	18
Discusión	32
Limitaciones del estudio	35
Conclusiones	36
Referencias	37

Resumen

Introducción: La leche materna contiene diversos componentes entre los que destacan los miRNAs que se encuentran conservados en distintas especies de mamíferos. Su principal función en el infante está relacionada con el sistema inmune, aunque también pueden estar implicados en el desarrollo neural y el metabolismo. **Justificación:** Los miRNAs son de interés en la investigación por su función en la regulación postranscripcional de la expresión genética. Es importante saber si la leche materna contiene miRNAs inmunorreguladores. Debido al aumento en la utilización de productos de fórmula láctea para la alimentación del bebé, que se contraponen a las recomendaciones de la OMS, se debe conocer si estos productos contienen los mismos miRNAs que la leche materna. **Alcance:** Analizar los niveles de expresión de cuatro miRNAs implicados en el desarrollo del sistema inmune del infante (miR-146, miR-148, miR-155 y miR-200) en leche materna. Y seis marcas de fórmula láctea utilizadas y recomendadas para la primera etapa de lactancia. **Hipótesis:** La leche materna mexicana presenta una mayor concentración de miRNAs inmunorreguladores que la fórmula láctea. **Objetivo:** Demostrar que la leche materna mexicana presenta una mayor concentración de miRNAs inmunorreguladores que la fórmula láctea. **Metodología:** Seleccionar muestras de leche materna. Diseñar oligos específicos de miRNAs inmunorreguladores importantes en el desarrollo del infante. Estandarizar la extracción de los miRNAs seleccionados en leche materna y fórmula láctea. Cuantificar los niveles de expresión de los miRNAs seleccionados presentes en leche materna y en fórmula láctea. **Conclusiones:** Se estandarizó la extracción de miRNA a partir de muestras de calostro/leche. Se encontró que el calostro/leche tiene una concentración más elevada de los miRNAs estudiados que la leche materna. Estos resultados suman evidencia al actual conocimiento de que la leche materna es un alimento irremplazable para el infante.

Abstract

Abstract: Human milk contains a myriad of diverse constituents, including miRNAs, these molecules are strongly conserved among mammal species. miRNAs play an important role in immune system regulation, but are also related with neural development and metabolism. **Justification:** miRNAs have been recently used on investigation for they can regulate gene expression at a post-transcriptional level. It is important to know whether human milk contains immunoregulatory miRNAs. Due to the increase in milk-formula products for infant alimentation, which opposes with World Health Organization recommendations, it should be known if this products and human milk are similar in miRNA content and composition. **Scope:** Analyze expression levels of four miRNAs associated with infant immune development (miR-146, miR-148, miR-155 and miR-200) in human milk. And six different brand milk-formulae employed and recommended for infant first stage of lactation. **Hypothesis:** Mexican human milk presents higher immunoregulatory miRNA concentration than milk-formula. **Objective:** Prove that Mexican human milk presents higher immunoregulatory miRNA concentration than milk-formula. **Methods:** Select human milk samples. Design specific primer for immunonoregulatory miRNAs important in infant development. Standardize selected miRNAs extraction from human milk and milk-formula. Quantify selected miRNAs expression levels in human milk and milk-formula. **Conclusions:** miRNA extraction from colostrum/milk was standardized. It was found in the four miRNAs, that levels in colostrum/milk was higher than those in milk-formula. This results provide evidence to current knowledge indicating that human milk is an indispensable food for infant nourishment and development.

Introducción

Lactancia

La lactancia es una etapa indispensable para el recién nacido e infante, ya que permite que su desarrollo se lleve a cabo de manera apropiada. La leche materna provee al lactante de múltiples beneficios a su salud entre los que cabe destacar menor riesgo de infecciones respiratorias y del tracto intestinal, así como mayor desarrollo cognitivo (Koh, 2017; Westerfield y cols., 2018). La madre, por otra parte, también se ve beneficiada durante esta etapa, pues la lactancia está relacionada con menor riesgo de desarrollar cáncer de mama y ovario, síndrome metabólico y depresión postparto (Sattari y cols., 2019; Sayres y cols., 2018;); además de que se ha visto que ayuda a reducir el estrés producido en un parto prematuro (Black, 2012). Por toda la evidencia que existe sobre los beneficios de esta etapa, se recomienda una alimentación exclusiva de leche materna durante los primeros 6 meses de desarrollo del lactante y continuar la lactancia durante al menos dos años (OMS, 2003).

La leche materna evolucionó para ser la alimentación perfecta para el bebé, al mismo tiempo que le brinda protección contra infecciones potenciales. Su composición es variable a lo largo del periodo de lactancia, pudiéndose distinguir entre calostro, leche de transición y leche madura; siendo el calostro la primer leche en ser producida y a transicionando paulatinamente a partir de el día 4 de lactancia aproximadamente hacia la leche madura (Ballard O. y Morrow, A. L., 2013). El calostro destaca más bien por su valor inmunológico que el alimenticio, pues se caracteriza por contener una alta concentración de proteína del suero, mientras que el contenido de lactosa y grasa es menor en comparación con la leche madura, además es rica en componentes bioactivos como inmunoglobulina A (IgA), lactoferrina y leucocitos (Mosca, y Gianni, 2017).

La leche materna es entonces un fluido biológico de gran valor nutricional cuya composición varía durante la lactancia, pero que, de manera general, consiste en macronutrientes entre los que se encuentran las grasas que le proporcionan al

infante aproximadamente la mitad de la energía que necesita, así como proteínas y carbohidratos para su correcto desarrollo, también incluye innumerables micronutrientes y componentes biológicos (Ver Lista 1). Entre los micronutrientes podemos encontrar minerales como calcio, zinc, potasio, fósforo, entre otros; componentes bioactivos como la lactoferrina y antioxidantes exógenos y endógenos (Keikha y cols., 2017; Gila-Díaz y cols., 2019; Eriksen y cols., 2018). Mientras que en los componentes biológicos se incluye la microbiota, con una dominancia de Proteobacteria y Firmicutes del 65 y 34%, respectivamente (McGuire, 2015; Gila-Díaz, 2019), hormonas y factores de crecimiento, componentes inmunológicos, tipos celulares y también vesículas extracelulares (Eriksen y cols., 2018; Gila-Díaz y cols., 2019; Keikha y cols., 2017; Mosca y Gianni, 2017, Zeng y cols., 2020).

Las vesículas extracelulares son estructuras lipídicas cuya principal función es el transporte de sustancias para la comunicación celular, se han encontrado en diversos fluidos del cuerpo como saliva, sangre y, por supuesto, leche materna (Lässer, C. y cols., 2011). En la leche humana y de otros mamíferos, se ha reportado las vesículas extracelulares llevan consigo una gran carga de RNAs no codificantes, implicados en varias funciones biológicas y enfermedades, estos RNAs se caracterizan por su interacción con otros ácidos nucleicos y con proteínas para la regulación epigenética de varios genes (Zempleni y cols., 2017; Zeng y cols., 2020). Entre este tipo de RNAs se incluyen RNAs largos no codificantes, RNAs mensajeros y también micro RNAs (miRNAs).

Además, se ha reportado que diversos tipos celulares liberan, al espacio extracelular, exosomas cargados con miRNAs que pueden actuar como mediadores sistémicos de la comunicación intercelular (Valadi, H. y cols., 2007; Barile, L., y Vassalli, G., 2017).

Los miRNAs son moléculas pequeñas de RNA (17-25 nucleótidos), conservadas, que regulan la expresión de genes eucariontes a nivel postranscripcional mediante la inhibición traduccional o la degradación del mRNA,

participando de esta manera, en procesos biológicos como el desarrollo, metabolismo, ciclo celular, proliferación, diferenciación y muerte (Correia y cols., 2019; Tafrihi y Hasheminasab, 2019). Aunque que los miRNAs se suelen unir a mRNA, también pueden llevar a cabo la regulación al formar complejos con proteínas e incluso otros miRNAs (Correia y cols., 2019; Tafrihi y Hasheminasab, 2019; Tomé-Carneiro y cols., 2018).

Los miRNAs son transcritos en el núcleo a partir de DNA genómico por la RNA polimerasa II, en una estructura inicial llamada pri-miRNA, a partir de ahí son cortados por un complejo formado entre la enzima Drosha y su cofactor DGCR8 para convertirse en pre-miRNAs y ser exportados hacia el citoplasma por exportina 5 y su cofactor Ran; posteriormente son procesados en miRNAs maduros por la enzima Dicer y proteínas argonautas (He, J., y cols., 2016). Es interesante mencionar que Dicer es además requerida para la función de los linfocitos, razón por la cual se comenzó a estudiar el papel regulador de los miRNAs en el sistema inmune (Otsuka, M., y cols., 2007).

Durante la lactogénesis, las partículas de leche son producidas por células epiteliales secretoras ubicadas en los alvéolos de la glándula mamaria, la leche es producto de prolongaciones del núcleo derivadas del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático rugoso que son expulsadas al lumen del alvéolo en forma de vesículas extracelulares (Bauman, D. E. y cols., 2006).

Como se ha discutido previamente, estas vesículas llevan en su interior miRNAs que son tomados por el infante y deben atravesar numerosas barreras que potencialmente afectan su biodisponibilidad como son las RNAsas de la saliva, las condiciones de bajo pH del intestino, las enzimas digestivas, la actividad de la degradación por enzimas de la microbiota, entre muchas otras, para ingresar al torrente sanguíneo del bebé y tener que soportar otra serie de dificultades adicionales (Tomé-Carneiro y cols., 2018).

Una vez ahí, los miRNAs pueden ser transportados y asimilados hacia las células donde ejercerán su función, en trabajos previos realizados en líneas celulares, se ha observado la capacidad de las células de absorber vesículas

extracelulares, Halkien, J. y cols. (2013) detectaron miR-146a en exosomas purificados a partir de HUVECs y encontraron que los cardiomiocitos tienen la capacidad de absorber exosomas con este miRNA; Zheng, B. y cols. (2017) estudiaron el transporte de miR-155 a través de exosomas y destacan que estas estructuras sirven para proteger al miRNA de la actividad de nucleasas presentes en los fluidos del cuerpo, además de que observaron que en este proceso estaban implicados factores de transcripción como *Kruppel like* factor 5 (KLF5) que estimula la producción de estas vesículas extracelulares.

Como se ha mencionado previamente en este trabajo, el calostro tiene una función principalmente inmunológica debido a su alto contenido proteico en el que principalmente destacan inmunoglobulinas y componentes bioactivos (Mosca, y Gianni, 2017), y por otra parte los miRNAs son moléculas implicadas en la regulación de genes, sugiriéndose su papel en funciones inmunológicas (Otsuka, M., y cols., 2007)

1. Macronutrientes

- a) Proteínas
 - Caseína
 - Suero
 - Mucinas
 - Amino ácidos libres
- b) Carbohidratos
 - Lactosa
 - Oligosacáridos de la Leche Materna (HMO)
- c) Lípidos
 - Ácidos grasos polinsaturados (PUFA)
 - Membrana de glóbulo de grasa de leche (MFGM)
 - Triacilgliceroles

2. Micronutrientes

- a) Calcio
- b) Tiamina
- c) Riboflavina
- d) B12
- e) Zinc
- f) Potasio
- g) Fósforo
- h) Lactoferrina
- i) Antioxidantes
 - alfa y beta-caroteno
 - licopeno
 - retinol
 - alfa-tocoferol
 - gamma-tocoferol
 - superóxido dismutasa
 - catalasa
 - glutatión peroxidasa
 - glutatión
 - melatonina

3. Componentes biológicos

- Vesículas extracelulares
- lncRNAs
- mRNAs
- miRNAs
- Microbiota
 - Staphylococcus
 - Streptococcus
 - Lactobacillus
 - Enterococcus
 - Lactococcus
 - Weissella
 - Veillonella
 - Bifidobacterium
- Hormonas
- Adiponectina
- Leptina
- Insulina
- Cortisol
- IGF-1
- Factores inmunológicos
 - Citocinas
 - sIgA
 - IgG
 - IgM
- Tipos celulares
 - Células epiteliales
 - Células madre
 - Células progenitoras
 - Leucocitos

Lista 1: Componentes generales de la leche materna. Elaborado a partir de Eriksen y cols., 2018; Gila-Díaz y cols., 2019; Keikha y cols., 2017; Mosca y cols., 2017; Boix-Amorós y cols., 2016; Togo y cols., 2019;

Antecedentes

Los miRNAs presentes en la leche materna han sido previamente encontrados de forma libre, o también empaquetados en vesículas extracelulares o exosomas (Lukasik y Zielenkiewicz, 2014). La expresión de miRNAs está relacionada a diversos factores a los que esté sometida la madre lactante, como son su dieta, peso, el momento del parto, e incluso pueden variar a lo largo del día además se ha señalado que el calostro contiene una mayor concentración de miRNAs que la leche madura (Tomé-Carneiro y cols., 2018).

Estudios anteriores a este han analizado los miRNAs de la leche, reportado que los miRNAs se encuentran conservados en distintas especies de mamíferos (Golan-Gerstl y cols., 2017). En lo referente a leche materna, existen algunos trabajos en los que se ha caracterizado la expresión de miRNAs en leche materna, Alsaweed, M., y cols. (2016). Estudiaron la presencia de miRNAs en leche materna por medio de secuenciación masiva y reportaron a let-7f-5p, miR-148^a-3p, miR-182-5p, miR-181^a-5p y miR-22-3p como las secuencias de miRNA conocidas más expresadas en leche materna. Golan-Gerstl y cols. (2017) reportaron que miR-148a-3p era el más expresado en leche materna y compararon su expresión contra fórmula láctea, encontrando mayores niveles de expresión de este miRNA en leche materna que en fórmula. Por otra parte, Zhou, Q., y cols. (2012), estudiaron miRNAs inmunorreguladores en leche materna, encontrando miRNAs como miR-148a-3p, let-7f-5p, miR-146b-5p, miR-141-3p, miR-200a-3p, entre otros.

Es de destacar que la principal función de los miRNAs más abundantes en leche está relacionada al sistema inmune, aunque también se han visto implicados con el desarrollo neural y el metabolismo (Zhou y cols., 2012; Golan-Gerstl y cols., 2017; Tomé-Carneiro y cols., 2018; Lönnerdal, 2019). De manera general, los miRNAs inmunorreguladores están asociados a la diferenciación de las células B, la selección de las células T CD4⁺, el desarrollo de los monocitos, la maduración y la regulación de la respuesta inmune de las células B y T, así como la

producción, activación y sensibilidad de TNF- α (Kosaka y cols., 2010; Tomé-Carneiro y cols., 2018; Lönnnerdal, 2019).

miR-146 se ha visto asociado a NF-kappaB y se ha reportado que regula de manera negativa a las citocinas pro-inflamatorias IL6, IL8 y CC-2, teniendo como blanco a TLR4 o interactuando directamente con el complejo IRAK/TRAF6 (Chen, Q. Z., 2017; Yang, K., 2011; Wu, W., y Li, Y., Taganov, K. D., 2006; Nahid, M. A., 2011). Además, suprime la respuesta a interferón tipo I (Fu, Y., 2017), regula la proliferación de células inmunes (Boldin, M. P. 2011) y disminuye la migración transendotelial de monocitos, anulando la respuesta inflamatoria del hospedero (Hu, W., 2020).

miR-148 se ha reportado como un regulador de la tolerancia de las células B y la autoinmunidad (González-Martín, A. y cols., 20016), por ejemplo, promueve mediante hipometilación, la sobreexpresión de CD70 y LFA-1, genes asociados a la supervivencia y activación de las células T, respectivamente (Pan, W., y cols., 2010) además de la inducción de FOXP3 seguida de una estimulación de los receptores de las células T (Josefowicz, S. Z., y cols., 2009).

miR-155, regula elementos centrales de la respuesta inmune adaptativa como la presentación del antígeno (Pedersen, I., y David, M. 2008), su expresión se ha visto sobrerregulada en células B y T activas (Tan W., 2001) y una supresión de este miRNA puede provocar cambios en las clases de inmunoglobulinas (Vigorito, E., y cols., 2007). Además, puede regular de manera negativa la respuesta inflamatoria al afectar la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, INF- α e IL-8 (Huang, R. S. y cols., 2010)

miR-200, por otra parte, se ha visto relacionado con la regulación negativa de la producción de citocinas como IL-6, IL-8, CCL-5 e IL-33 (Hong, L., y cols., 2016; Tang, X., 2018), además de que regula la cascada de señalización ERK1 y ERK2 (Shi, L., 2013) y está relacionado con la diferenciación de células T (Zárate-Neira, L. Á., y cols., 2017).

En un estudio realizado previamente en este grupo de trabajo, (Aguilera Hernández, 2021) se seleccionaron las secuencias miR-148a-3p, miR-181a-5p,

miR-146b-5p, miR-200a-3p y miR-155-5p, por su función como miRNAs inmunorreguladores, se diseñaron oligos específicos para cada blanco y se comprobó la especificidad de estos oligos mediante la clonación de un producto de PCR de los mismos y su posterior secuenciación, donde se observó un 100% de consenso entre el producto de PCR clonado y la secuencia del miRNA que se buscaba.

Justificación

La leche materna evolucionó para ser la alimentación perfecta para el bebé, durante los últimos años, los miRNAs han cobrado especial interés en la investigación debido a la función que ejercen para la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional. La población mexicana cuenta con una gran variabilidad genética y está expuesta a condiciones ambientales muy diversas por lo que sería interesante saber si los miRNAs presentes en leche materna de mujeres mexicanas corresponden con los reportados por la literatura. Por otra parte, debido al aumento en la utilización de productos de fórmula láctea para suplementar la alimentación del bebé, que se contraponen a las recomendaciones de la OMS, es importante conocer si este alimento proporciona las sustancias necesarias para el correcto desarrollo del lactante.

Alcance

En este estudio se busca analizar los niveles de expresión de miRNAs implicados en el desarrollo del sistema inmune del infante (miR-146, miR-148, miR-155 y miR-200), presentes en muestras de leche materna de mujeres del municipio de Ecatepec de Morelos, Estado de México en el Hospital General “Dr. José María Rodríguez”. Se estudian seis marcas de fórmula láctea que destacan por ser altamente utilizadas y recomendadas para la primera etapa de lactancia.

Hipótesis

La leche materna mexicana presenta una mayor concentración de miRNAs inmunorreguladores que la fórmula láctea.

Objetivo general

Demostrar que la leche materna mexicana presenta una mayor concentración de miRNAs inmunorreguladores que la fórmula láctea.

Objetivos particulares

Objetivo particular 1. Seleccionar muestras de leche materna.

Actividad 1.1. Recolección de las muestras del Laboratorio de Referencia y apoyo para la Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav Unidad Zacatenco.

Objetivo particular 2. Diseñar oligos específicos de miRNAs inmunorreguladores importantes en el desarrollo del infante.

Actividad 1. Búsqueda bibliográfica para la selección de miRNAs implicados en el desarrollo del infante.

Actividad 2. Diseño de oligos en stem-loop para los miRNAs seleccionados previamente, útiles para RT-PCR.

Actividad 3. Diseño de oligos para los miRNAs seleccionados previamente, útiles para qPCR.

Objetivo particular 3. Estandarizar la extracción de los miRNAs seleccionados en leche materna y en fórmula láctea.

Actividad 1. Extracción de RNA a partir de muestras de leche materna.

Actividad 2. Análisis de la concentración y pureza del RNA extraído.

Actividad 3. Comprobación de la integridad del RNA extraído.

Objetivo particular 4. Cuantificar los niveles de expresión de los miRNAs seleccionados presentes en la leche materna y en fórmula láctea.

Actividad 1. Síntesis selectiva de cDNA de los miRNAs de interés con los oligos RT en stem-loop.

Actividad 2. Cuantificación de miRNAs de interés por qPCR.

Metodología

Muestra

Para llevar a cabo este trabajo, se realizó un tipo de estudio descriptivo transversal, buscando las secuencias de los miRNAs miR-146, miR-148, miR-155 y miR-200 en leche humana y fórmula láctea.

Leche Materna

Para la selección de muestras, se acudió a la Colección de Leche del Laboratorio de Referencia y Apoyo a la Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular ubicado en el Cinvestav, Unidad Zacatenco; estas muestras fueron adquiridas previamente (García-González, I., Corona-Cervantes, K, Hernández-Quiroz, F., 2021) del Hospital General «Dr. José María Rodríguez» en el municipio de Ecatepec de Morelos, Estado de México, en un periodo conformado entre octubre de 2017 y enero del 2018. Después de su colecta, las muestras fueron almacenadas en alícuotas de 1 mL a -20°C para su preservación.

Fórmula láctea

En el caso de las muestras de fórmula láctea, se seleccionaron productos utilizados para la primera lactancia del neonato, que tuvieran como base leche bovina y que estuvieran disponibles en el país. Estas fórmulas se prepararon en esterilidad el mismo día en que se realizó la extracción, diluyendo la cantidad de producto especificado en la etiqueta en agua libre de nucleasas (Sigma-Adrich®, Cat. W4502-1L), vortexeando para lograr una mezcla homogénea. Se preparó una cantidad total de 20 mL en tubo Falcon, tomando tres alícuotas de 1 mL por cada fórmula, para utilizarse en la extracción. El resto, se almacenó a -20°C.

Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

En la ejecución de este estudio, se seleccionaron mujeres sanas, de origen mexicano (con al menos dos generaciones de ancestría), que se encontraban durante un periodo de lactancia menor a 8 días después del parto; por otra parte, se excluyeron mujeres que a lo largo de su embarazo llevaron tratamiento hormonal o de antibióticos, que consumieron alcohol, cigarros o cualquier droga y/o sufrieron síndrome metabólico. Se eliminaron del estudio muestras cuyo control interno (cel-miR-39) se hubiera degradado durante el proceso de extracción. Todas las mujeres que participaron en este trabajo dieron su consentimiento informado por escrito, de acuerdo con la declaración de Helsinki, 2013. Además, el trabajo fue aprobado por un comité de bioética’.

Diseño de oligos

Se seleccionaron los miRNAs miR-146, miR-148, miR-155 y miR-200 a partir de un trabajo de tesis realizado previamente en este equipo de trabajo, estos miRNAs se caracterizaron por ser abundantes en leche materna y estar implicados en el sistema inmune del neonato. La selección se realizó con base en una búsqueda en la base de datos de artículos científicos PubMed, incluyendo publicaciones originales y de revisión entre los años 2000 y 2020, utilizando los términos «miRNAs, leche materna, leche de formula, miRNAs inmunorreguladores». Las secuencias crudas de los miRNAs fueron obtenidas de la base de datos miRBase. A partir de estas secuencias, se hizo uso del software CLC Workbench v.8.1.3 para el diseño de oligos en stem-loop para la síntesis de cDNA mediante RT-PCR y oligos comunes para la cuantificación por qPCR (Aguilera-Hernández, A., 2020).

Extracción de RNA

A partir de aproximadamente 1 mL de calostro, leche de transición o de fórmula láctea, respectivamente, se fraccionó en la centrífuga refrigerada Neofuge 13R

(HealForce®) en tubos de polipropileno de 1.5 mL, a 13 800 rpm, durante 5 min, a una temperatura de 4°C, centrifugando de nuevo en caso de que no se formaran tres fases. Se descartó la fracción proteica (fase intermedia), con ayuda de puntas con filtro de 100 µL y la micropipeta correspondiente; se conservaron las fracciones lipídica y celular. Se lavó dos veces con 1 mL de PBS frío, disgregando la pastilla en vórtex y se centrifugó bajo las condiciones anteriores después de cada enjuague, dejando de nuevo únicamente la fracción lipídica y celular. Ambas fracciones se bajaron con un spin de 10 segundos. Para la extracción de RNA se utilizó el kit comercial mirVana™ miRNA Isolation Kit (Invitrogen™, Cat. AM1560) siguiendo el protocolo de extracción de RNA total como se detalla a continuación:

Lisado

Se disoció la muestra agregando 600 µL de Lysis/Binding Buffer y se vortexeó hasta disgregar la pastilla. Posterior a esto, se agregaron 3 µL de cel-miR-39 (microRNA(cel-miR-39) Spike-In Kit, Cat. 59000) a una concentración de 33 fmol para utilizarse como control interno de la extracción y los subsecuentes experimentos. Se añadieron 60 µL de miRNA Homogenate Additive, se vortexeó por 10 s y se incubó en hielo durante 10 min.

Extracción orgánica

Se añadieron 600 µL de Ácido fenólico: Cloroformo y se vortexeó durante un minuto. Se centrifugó 5 min, 11 500 rpm, 24°C, esperando observar una interfase proteica delgada, en caso de que no estuviera bien definida, se repitió la centrifugación. Se trasladó la fase acuosa a un tubo eppendorf estéril, asegurándose de no tomar la interfase y midiendo el volumen acuoso recuperado. Se agregó entonces etanol absoluto 1.25 veces el volumen acuoso recuperado y se mezcló invirtiendo el tubo tres veces.

Filtrado y lavado

En cartuchos con filtro colocados sobre tubos colectores incluidos en el kit, se añadieron 700 µL de la mezcla lisado/etanol y se centrifugaron los filtros 15 s, 10

000 rpm, descartando el filtrado y repitiendo este paso hasta filtrar todo el volumen disponible de la mezcla.

Se inició el lavado agregando al filtro 700 µL de miRNA Wash Solution 1, se centrifugó 10 s, 10 000 rpm, descartando el filtrado. Luego se agregaron 500 µL de Wash Solution 2/3, se centrifugó 10 s, bajo las condiciones anteriores y se realizó el lavado con esta solución otra vez. Se secó la columna centrifugando 1 min, 10 000 rpm y se cambiaron los filtros a un tubo colector nuevo.

Elución y almacenaje

Se eluyó la muestra agregando 100 µL de Elution Solution precalentada a 95°C por 1 min, se centrifugó 1 min, 10 000 rpm y se descartó el filtro. Se alicuotaron 40 µL de RNA para el protocolo y se almacenaron los 60 µL restantes como stock a -70°C.

Integridad y pureza

Se analizó la integridad y pureza del RNA en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2%, así como la concentración y pureza a un cociente de absorbancia 260/280 con el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Cat. ND-2000).

Síntesis de cDNA

A partir del RNA purificado, se realizó la síntesis de cDNA con el kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™, Cat. 4366596), siguiendo las instrucciones del fabricante, como se detalla a continuación:

Mezcla de reacción

Se preparó una mezcla de reacción que consiste en 4.16 µL de agua libre de nucleasas, 1.50 µL de Buffer de Transcripción Reversa 10X, 0.19 µL de Inhibidor de RNAsas 20 U/µL, 0.15 µL de dnTPs (con dTTP) 100 mM y 1 µL de Transcriptasa Reversa Multiscribe™ 50 U/µL, por reacción.

Mezcla RT

Para cada blanco analizado se preparó una mezcla RT independiente que consistió en 7 μ L de mezcla de reacción y 3 μ L de primer RT (RT-miR-146, RT-miR-148, RT-miR-155, RT-miR-200 y RT-cel-miR-39, respectivamente) por cada reacción. A estos 10 μ L de mezcla se le agregaron 5 μ L de RNA de la muestra, teniendo un volumen final de reacción de 15 μ L.

Controles negativo y positivo

Por otra parte, se preparó un control negativo utilizando 7 μ L de mezcla de reacción, 3 μ L de oligo dT y 5 μ L de agua libre de nucleasas; y un control positivo a partir de 7 μ L de mezcla de reacción, 3 μ L de oligo dT y 5 μ L de mRNA GAPDH. El oligo dT y el mRNA GAPDH fueron obtenidos de los reactivos del kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™, Cat. K1622).

Programa del termociclador

Las reacciones fueron preparadas en tubos de PCR, se vortexearon por 5 s y se les dio un spin de 5 s, para homogenizar. Después se colocaron en el termociclador Applied Biosystems 2720 con un programa de 16°C, 30 min; 42°C, 30 min; 85°C, 5 min y 4°C, 10 min. Los cDNA se almacenaron de manera ordenada a -20°C.

Cuantificación e integridad

Los cDNAs se cuantificaron en el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Cat. ND-2000), para poder normalizar las concentraciones en la qPCR. Además, se realizó gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% de muestras al azar y los controles, para asegurar que el procedimiento se realizó de manera correcta.

Cuantificación de miRNAs

A partir del cDNA se realizó PCR en tiempo real o qPCR para cuantificar los miRNAs de interés en el trabajo, para ello, se utilizaron los reactivos de Maxima

SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific™, Cat. K0222) como se indica a continuación:

Mezcla de reacción

Se preparó una mezcla de reacción que consistió en 11 µL de agua libre de nucleasas, 1.1 µL de primer URP (diseñado para los miRNAs de interés) y 12 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X, por cada reacción.

Mezcla FmiR

Para cada blanco analizado, se preparó una mezcla FmiR independiente que consistió en 24.1 µL de mezcla de reacción y 1.1 µL de primer FmiR (FmiR-146, FmiR-148, FmiR-155, FmiR-200 y Fcel-miR-39, respectivamente) por cada reacción. Posteriormente, se agregó a cada reacción 1 µL de cDNA correspondiente. Además, se consideró una reacción FmiR adicional para el control negativo de cada blanco.

Diseño de placa

De acuerdo con las capacidades del termociclador, se utilizaron placas de 48 pozos para colocar las reacciones, estas placas tienen una distribución de 8 pozos de largo (numerados del 1 al 8), por 6 pozos de alto (con las letras de la A a la F). Dentro de estas placas se asignó una fila de manera horizontal para cada uno de los miRNAs/oligos FmiR (miR-146, fila A; miR-148, fila B; miR-155, fila C; miR-200, fila D; cel-miR-39, fila E), dejando un espacio en los pozos 7 para colocar el control negativo en el pozo 8 de su respectiva fila. Las reacciones se realizaron por triplicado, de manera que se asignaron las columnas de la 1 a la 3 para la primera muestra, y las columnas de la 4 a la 6 para la segunda.

Programa del termociclador

La placa se centrifugó y se colocó en el termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Cat. 4376357) con la configuración de la placa descrita en el párrafo anterior y con un protocolo de PCR en dos pasos como se detalla a continuación: Desnaturalización, 95° C, 10 min; seguida de 40 ciclos

de 95° C, 15 s y 60° C, 60 s. Además, se agregó una curva de disociación de 95° C, 15 s; 60° C, 60s y 95° C, 15s. Al terminar, las placas fueron almacenadas a -20° C.

Análisis bioinformático y estadístico

Software utilizado

Todos los datos de este estudio fueron analizados con el lenguaje y entorno de programación R (R Core Team, 2017), en el software RStudio 1.4.1717 (RStudio Team, 2021) y utilizando los paquetes 'readr' (Wickham, H. y J. Hester, 2020), 'dplyr' (Wickham, H., François, R., y cols., 2021), 'scales' (Wickham, H. y Seidel, D., 2020) y 'tidyr' (Whickam, H., 2021). Los Ct fueron calculados por el software Step One Software v2.2.2, esta información fue exportada y convertida a formato de valores separados por comas (.csv).

Análisis de datos y pruebas estadísticas

Para el análisis de datos se utilizaron scripts de elaboración propia, con ayuda de las funciones descritas previamente. Se utilizó el método comparativo $2^{-\Delta Ct}$ (Schmittgen, T. D. y Livak, K. J. 2008), para calcular los perfiles de expresión de los miRNAs, considerando cel-miR-39 como control interno de la muestra. Se utilizaron la media y desviación estándar geométricas, dada la naturaleza logarítmica de los Ct. Cuando se trabajó con datos en escala lineal, se utilizaron las medidas de tendencia central habituales. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía para buscar diferencias en los niveles de expresión entre miRNAs de leche materna y la prueba de Kruskal-Wallis para buscar diferencias en los niveles de expresión de los miRNAs en leche materna a distintos días después del parto. Además, se buscaron diferencias entre la expresión de miRNAs en leche materna y fórmula láctea con la Prueba U de Mann-Whitney.

Presentación de datos

Las tablas fueron elaboradas en R y exportadas a formato html para su inclusión en el trabajo con el paquete 'sjPlot' (Lüdecke, D. 2021), los gráficos fueron elaborados con el paquete 'ggplot2' (Whickam, H., 2016) y exportados a jpg con una resolución de 300 dpi/ppi.

Resultados

Datos generales de la población

Para el estudio, se seleccionaron 60 muestras de madres mexicanas sanas. Las muestras fueron recolectadas en un periodo de aproximadamente tres meses, que fue conformado del 16 de octubre del año 2017 al 29 de enero del 2018 (Fig. 1).

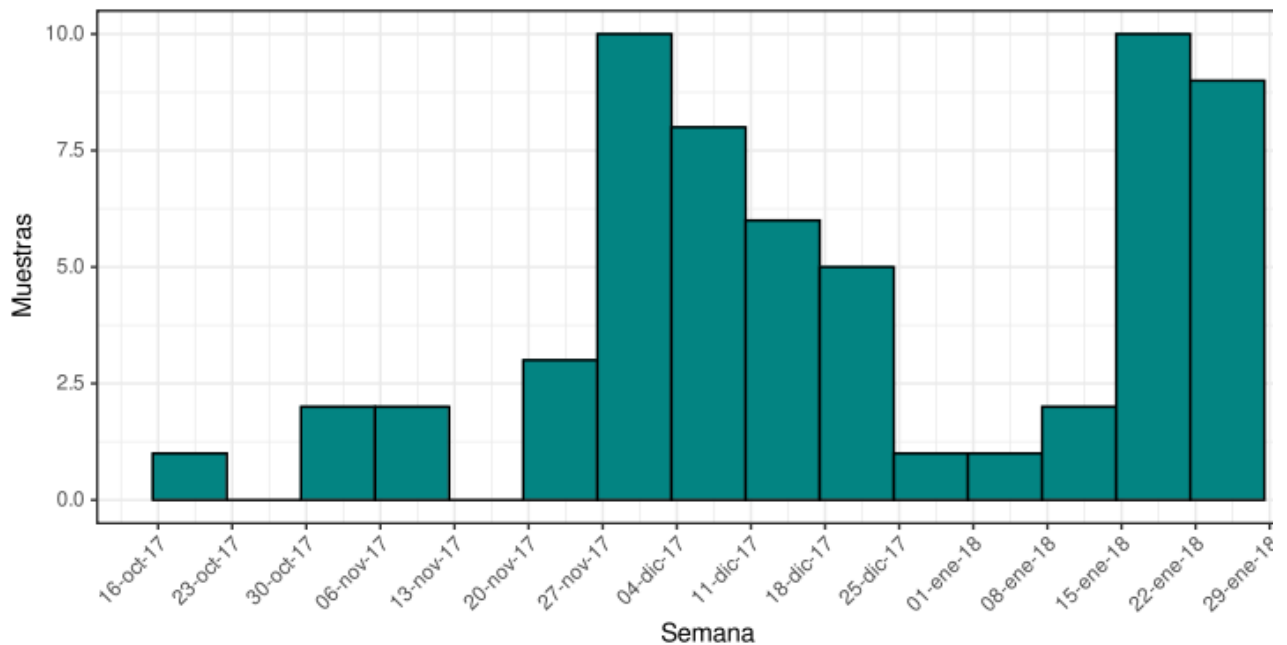


Figura 1: Periodo de colecta de las muestras utilizadas en este estudio, en semanas. Las muestras fueron tomadas en un periodo del 16 de octubre de 2017 al 29 de enero del 2018.

Además, las muestras recuperadas fueron tomadas en una etapa de lactancia menor a 8 días después del parto (Fig. 2). La mitad de las muestras fue recolectada un día después del parto, implicando esto que la mayoría de las muestras fueron menores o iguales a 4 días después del parto (periodo de calostro) y solo una pequeña parte fue recolectada después de 4 días (periodo de leche de transición).

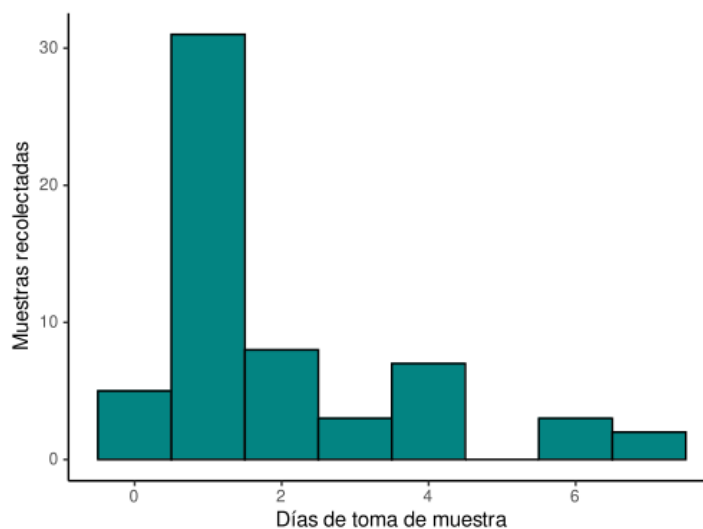


Figura 2: Días de toma de muestra con respecto al periodo de lactancia materno, dividido en días post-parto. Las muestras fueron tomadas en un tiempo menor a 8 días post-parto. La mitad de las muestras fueron tomadas un día después del parto, la mayoría de ellas antes de 4 días post-parto y unas pocas después de 4 días o más post-parto.

Durante la recolección de muestras se obtuvo información de las madres participantes en lo concerniente a datos antropométricos, datos sobre el parto y datos socioeconómicos (Tablas 1, 2 y 3). Los datos antropométricos fueron tomados antes del embarazo y se encontró una edad promedio de 22.93 años,

una estatura de 1.57 m, un IMC promedio de 23.22 kg/m², y un peso promedio de 56.58 kg (Tabla1).

Tabla 1: Datos antropométricos de las madres participantes en el estudio.

<i>Datos antropométricos</i>	<i>Promedio</i>	<i>N</i>
Edad	22.93 ± 4.95	60
Estatura	1.57 ± 0.07	55
IMC	23.22 ± 3.74	48
Peso	56.48 ± 10.01	50

Por otra parte, el 71.72% de los partos fueron vaginales, el 21.67% cesárea de urgencia y el 6.71% cesárea de elección, todas las madres participantes tuvieron un parto a término. El 72.93% de las mujeres fueron multíparas y el 21.17% primíparas. Además, en el 82.95% de los partos de las mujeres se realizó un a extracción manual y en el 17.05% la extracción fue con bomba (Tabla 2).

Tabla 2: Datos del parto de las madres participantes en el estudio.

<i>Datos del parto</i>	<i>madres</i>	<i>porcentaje</i> <i>e</i>	<i>N</i>
<i>Tipo de parto</i>			
Cesárea de elección	4	6.71%	60
Cesárea de urgencia	13	21.67%	
Vaginal	43	71.72%	
<i>Paridad</i>			
Múltipara	43	72.93%	59
Primípara	16	27.17%	
<i>Tipo de extracción</i>			
Con bomba	7	17.05%	41
Manual	34	82.94%	

Todos los partos de las madres participantes fueron a término (entre la semana de gestación 37 y 42).

En el caso de los datos socioeconómicos, la mayoría de las madres (59.95%) provenían del Estado de México, un 24.97% de la Ciudad de México y el resto de otros estados del país. En lo referente a la ocupación 88.11% se dedicaba al hogar, el 8.47% trabajaba fuera de casa y el 3.41% estudiaba. En cuanto al nivel educativo, 59.95% tenían estudios educativos hasta nivel secundaria, 33.33% hasta nivel primaria, 1.65% hasta nivel preparatoria y 4.85% hasta nivel superior (Tabla 3).

Tabla 3: Datos socioeconómicos de las madres participantes en el estudio.

<i>Datos socioeconómicos</i>	<i>madres</i>	<i>porcentaje</i>	<i>N</i>
------------------------------	---------------	-------------------	----------

<i>Origen</i>			
Ciudad de México	15	24.97%	60
Estado de México	36	59.95%	
Guerrero	2	3.30%	
Hidalgo	1	1.65%	
Oaxaca	3	4.95%	
Puebla	2	3.30%	
Veracruz	1	1.65%	
<i>Ocupación</i>			
Ama de casa	52	88.11%	59
Estudiante	2	3.41%	
Trabajadora	5	8.47%	
<i>Nivel educativo</i>			
Preparatoria	1	1.65%	60
Primaria	20	33.33%	
Secundaria	36	59.95%	
Superior	3	4.95%	

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Posteriormente, se realizaron las extracciones de RNA de las muestras y se encontró una concentración promedio de 15.82 ng/μL y una pureza promedio de 1.72. En la Figura 3 puede observarse que las concentraciones de las muestras tienen una distribución normal.

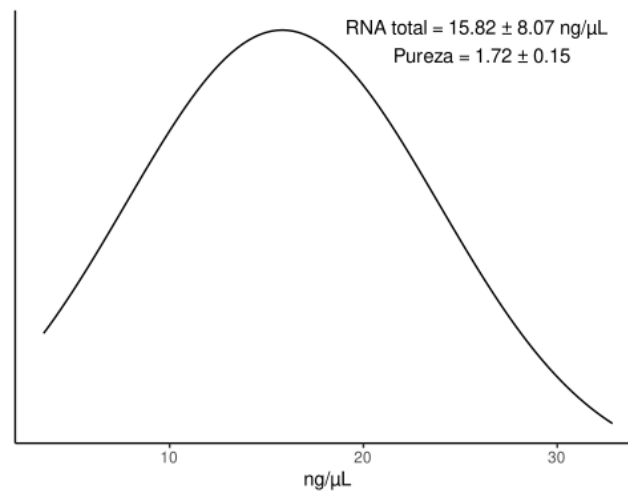


Figura 3: Resultados de la extracción de RNA medidos con NanoDrop. La concentración promedio de RNA de las muestras fue de 15.82 ng/ μ L y la pureza promedio de 1.72.

Al realizar síntesis de cDNA con oligos en stem-loop, la secuencia del oligo permite atrapar la secuencia del miRNA maduro blanco y la enzima sintetiza la cadena complementaria a la secuencia blanco, obteniéndose como resultado un híbrido RNA-DNA que es posible visualizar en un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Como se observa en la Figura 4, los amplicones observados en el gel corresponden a un producto de aproximadamente 25 pb, como indica el marcador de peso molecular, esto corresponde con las secuencias de los miRNAs analizados en el trabajo.

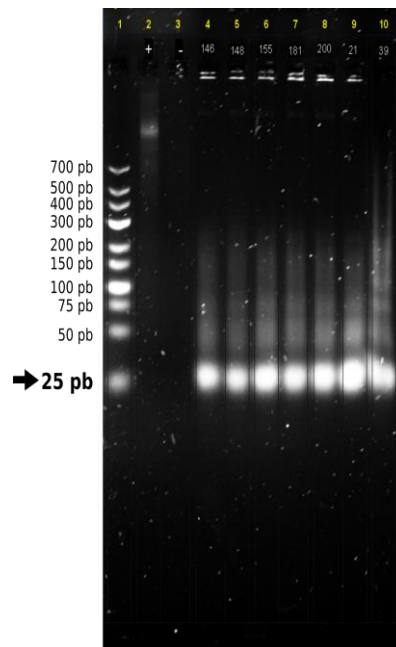


Figura 4: Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% donde se evalúa el cDNA de los miRNAs de interés en una muestra de calostro/leche. En el carril 1 se observa un marcador de talla molecular de los 25 a los 700 pb. En el carril 2, un control positivo de mRNA GAPDH. En el carril, un control negativo. De los carriles 4 al 10 se observan los miRNAs de interés y puede notarse en cada uno de ellos, un producto de 25 pb.

qPCR

Una vez confirmado que el cDNA se encontraba en buenas condiciones, se procedió con la cuantificación mediante qPCR. En la Figura 5, se observan los gráficos de amplificación de una muestra de leche materna y otra de fórmula láctea. Puede observarse que la curva que corresponde al control interno (color azul), es muy similar entre ambos casos.

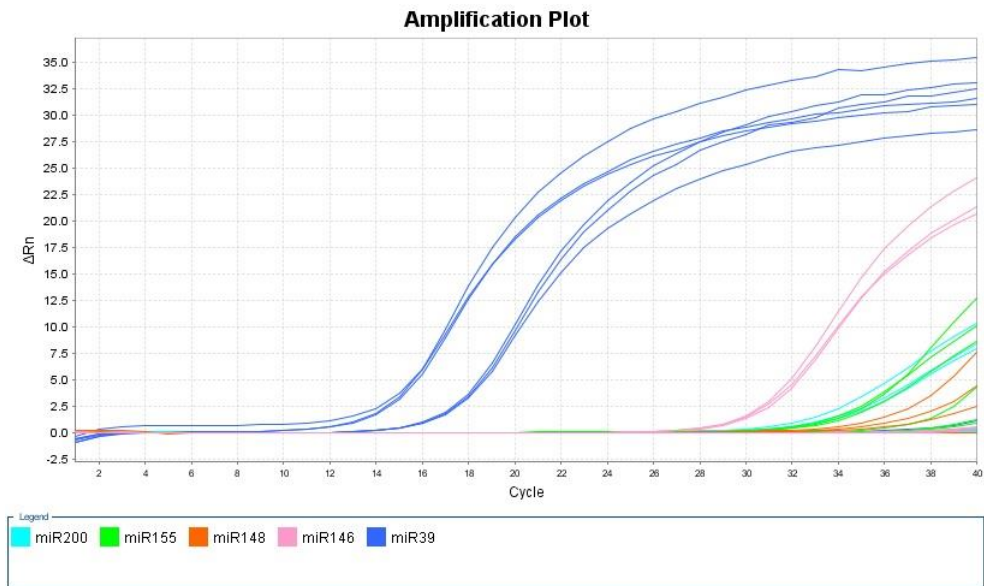


Figura 5: Gráfico de amplificación realizado por el Step One Software v2.2. Se compara una muestra de calostro/ leche contra una de fórmula láctea, puede notarse que la amplificación del control interno fue alta y semejante en ambas muestras.

Por otra parte, en la Figura 6 se muestran los gráficos elaborados a partir de la curva de disociación desarrollada en el último paso de la qPCR y puede observarse que las temperaturas de disociación fueron similares para los cinco miRNAs evaluados, además de que en todas las ocasiones se presentó un solo pico definido.

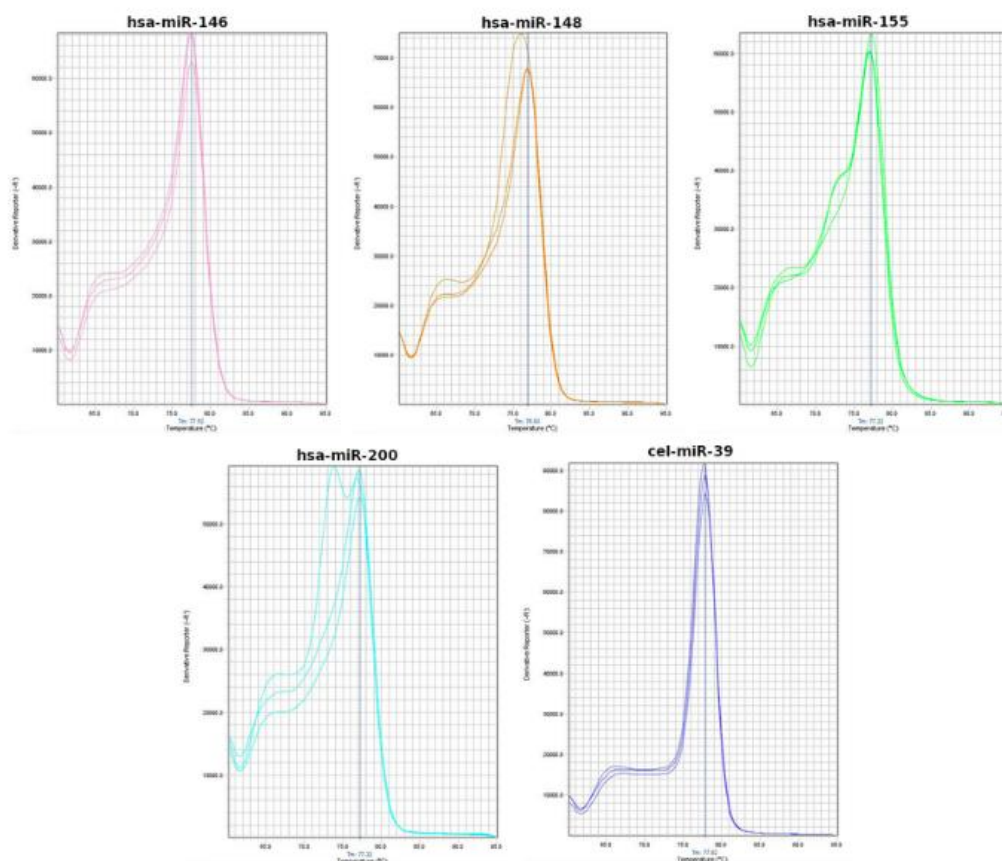


Figura 6: Curva de disociación realizada por el Step One Software v2.2. Se observa un pico definido para cada uno de los miRNAs evaluados y el control interno, lo que indica la amplificación de un solo producto específico.

A partir de los C_T calculados con el programa Step One Software v2.2.2, se utilizó el método de $2^{-\Delta C_T}$ para obtener el perfil de expresión de los miRNAs.

Los miRNAs mir-146, miR-148, miR-155 y miR-200 se normalizaron con respecto al control interno cel-miR-39. En la Figura 7, se muestra la distribución de los C_T de cel-miR-39, puede notarse que el promedio de C_T (utilizando la media geométrica) se encontró en 16.8221, teniéndose un rango de valores que va de aproximadamente los 12 a 22 ciclos y algunos datos atípicos por encima 22 ciclos.

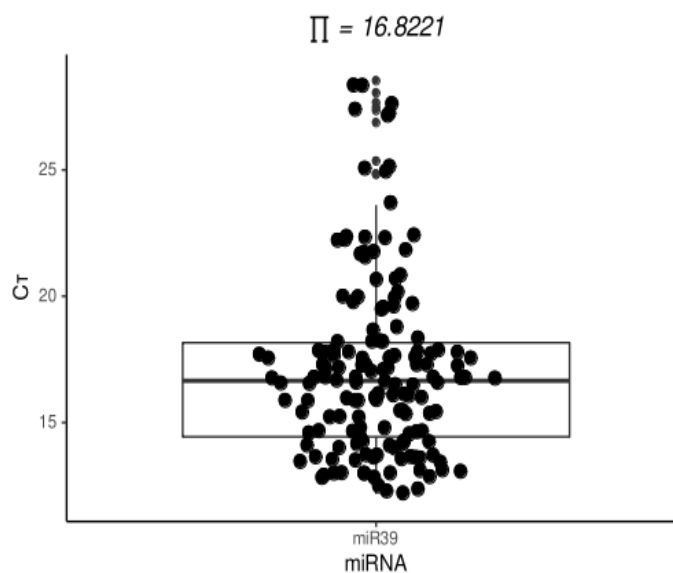


Figura 7: Gráfico de dispersión donde se observan los C del control interno de cada una de las muestras evaluadas. Utilizando la media geométrica , se obtuvo un Cm promedio de 16.8221

Se evaluó la expresión de los miRNAs miR-146, miR-148, miR-155 y miR-200 en calostro/leche y se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía para buscar diferencias entre los niveles de expresión de los mismos, obteniéndose un valor de $\text{Pr}(> F)$ de 0.7136, lo que implica que no existieron diferencias estadísticas (Fig. 8).

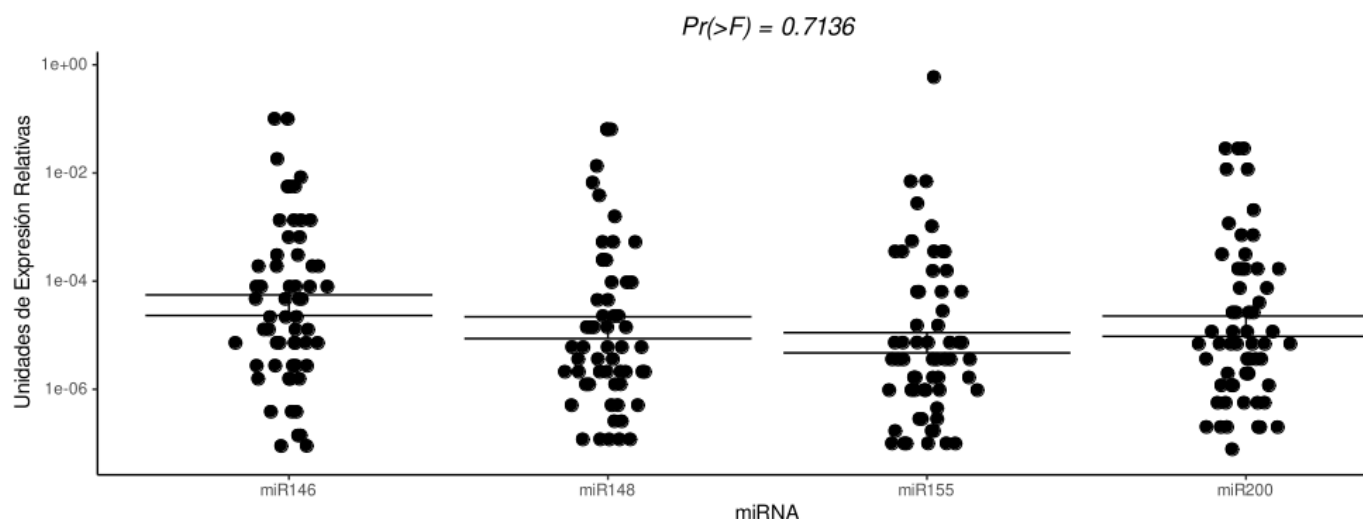


Figura 8: Niveles de expresión de los miRNAs miR-146, miR-148, miR-155 y miR-200 en calostro/ leche. Se utilizó la prueba estadística de ANOVA de una vía para buscar diferencias significativas en cada uno de los blancos, el estadístico $Pr(>F) = 0.7136$ no reporta diferencias significativas, además los datos se encuentran dispersos de manera similar y las barras de error estándar de la media se superlapan.

Además, se elaboraron categorías con base en el periodo de lactancia en que se recolectaron los datos y se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para buscar si existieron diferencias entre los niveles de expresión de los miRNAs evaluados en los distintos días de toma de muestra después del parto, y a pesar de que visualmente pareciera existir una tendencia al aumento en la expresión en el día 3, no se encontró diferencia estadística en ninguno de los casos, con valores de p de 0.3458 para miR-146, 0.2677 para miR-148, 0.0641 para miR-155 y 0.4642 para miR-200 (Fig. 9).

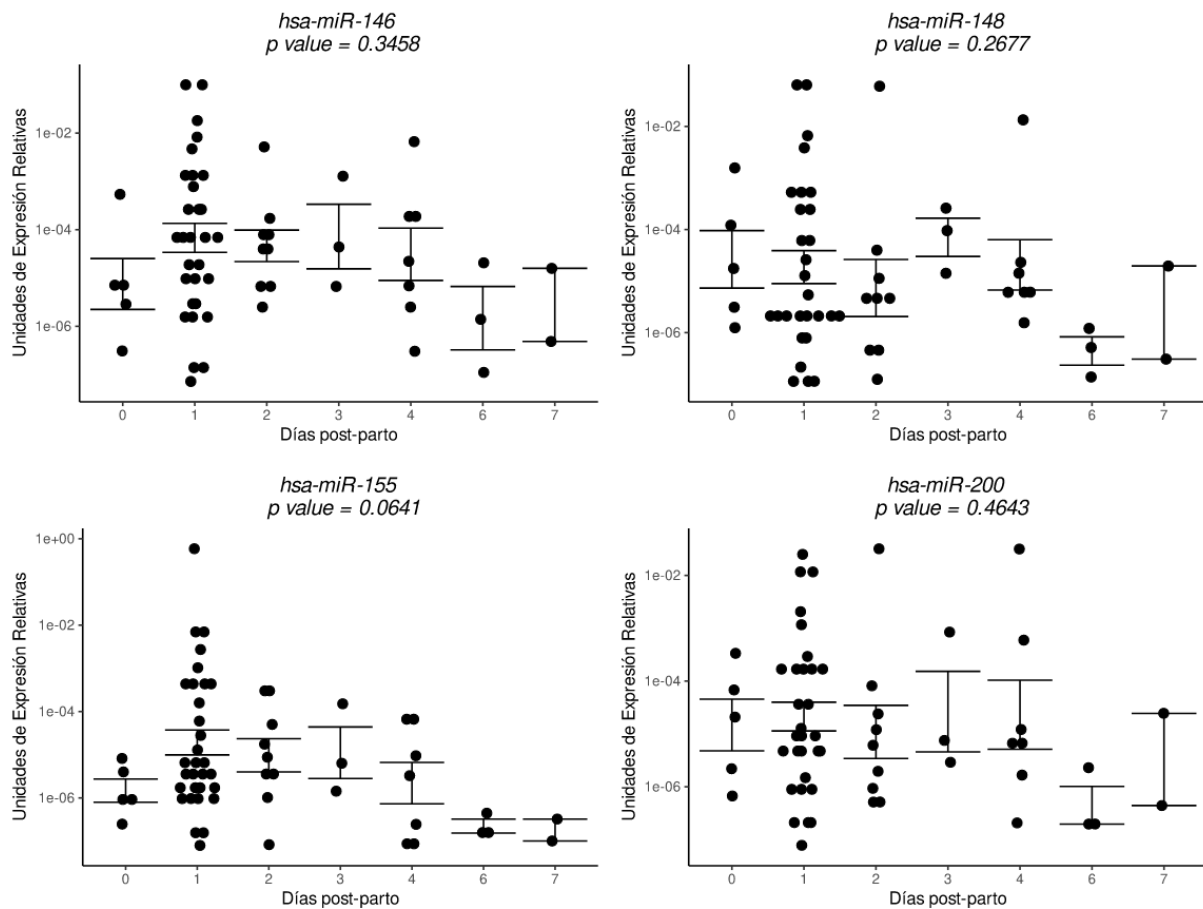


Figura 9: Niveles de expresión de los miRNAs miR-146, miR-148, miR-155 y miR-200 en calostro/leche a distintos días post-parto. Las barras de error indican una posible tendencia al aumento de expresión en el día 3. Se realizó la prueba estadística Kruskal-Wallis para confirmar esta tendencia, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión a ninguno de los días post-parto en los miRNAs mencionados.

Finalmente, para responder a la hipótesis central de este trabajo, se comparó la expresión de los miRNAs miR-146, miR-148, miR-155 y miR-200 en calostro/leche contra fórmula láctea, en el grupo de calostro/leche se seleccionaron 60 muestras y para el grupo de fórmula láctea, se realizaron tres extracciones independientes de seis marcas comerciales, teniéndose un número de muestras final de 18. Dada la diferencia en el número de datos entre ambos grupos, se realizó la prueba U de Mann-Whitney para cada uno de los blancos mencionados (Figs. 10, 11, 12 y 13).

En el caso de miR-146, se encontró un valor de p de 9×10^{-7} , lo que implica una diferencia estadística significativa (Fig. 10).

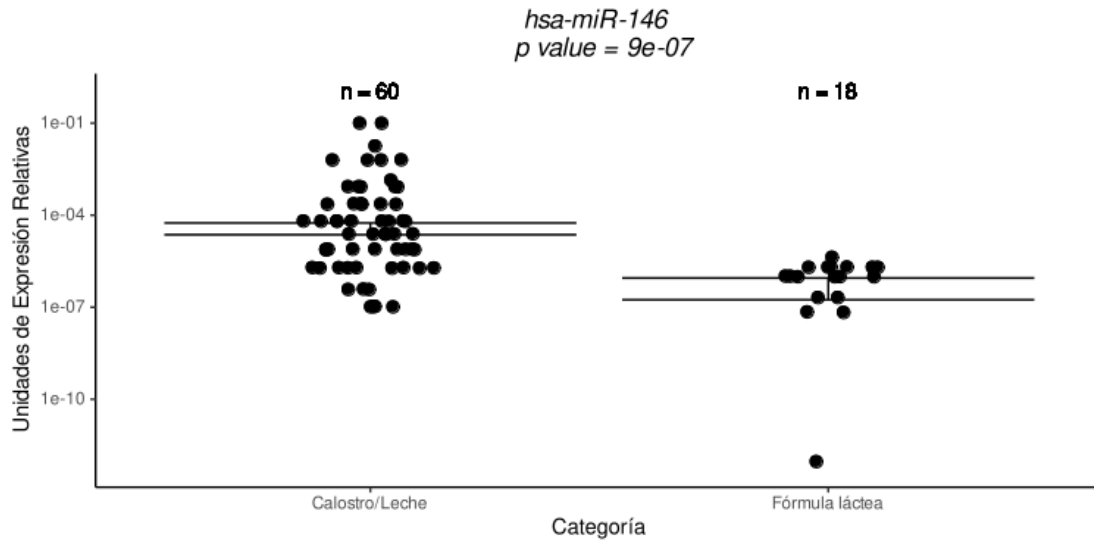


Figura 10: Niveles de expresión de miR-146 en calostro/leche y fórmula láctea. Se confirma la hipótesis alterna $H1: \eta_1 > \eta_2$, con un valor de $p = 9 \times 10^{-7}$.

Para miR-148, el valor de p fue de 1.1×10^{-7} , teniendo también una diferencia estadística significativa bastante marcada (Fig. 11).

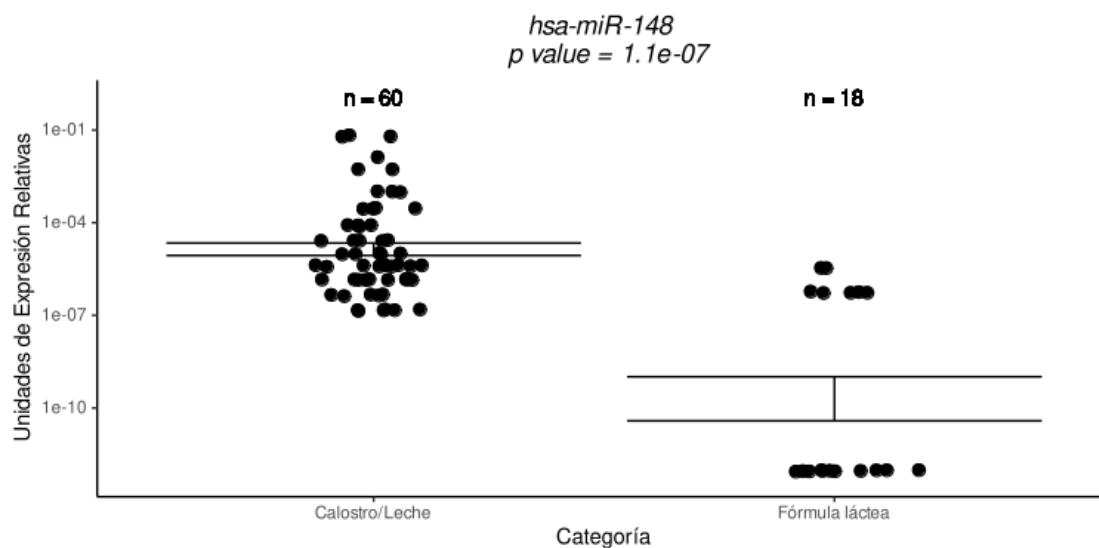


Figura 11: Niveles de expresión de miR-148 en calostro/leche y fórmula láctea. Se confirma la hipótesis alterna $H1: \eta_1 > \eta_2$, con un valor de $p = 1.1 \times 10^{-7}$.

En cuanto a miR-155, a pesar de que el valor de p fue el más alto, fue menor a 0.01, correspondiendo a un valor de 0.0093 (Fig. 12).

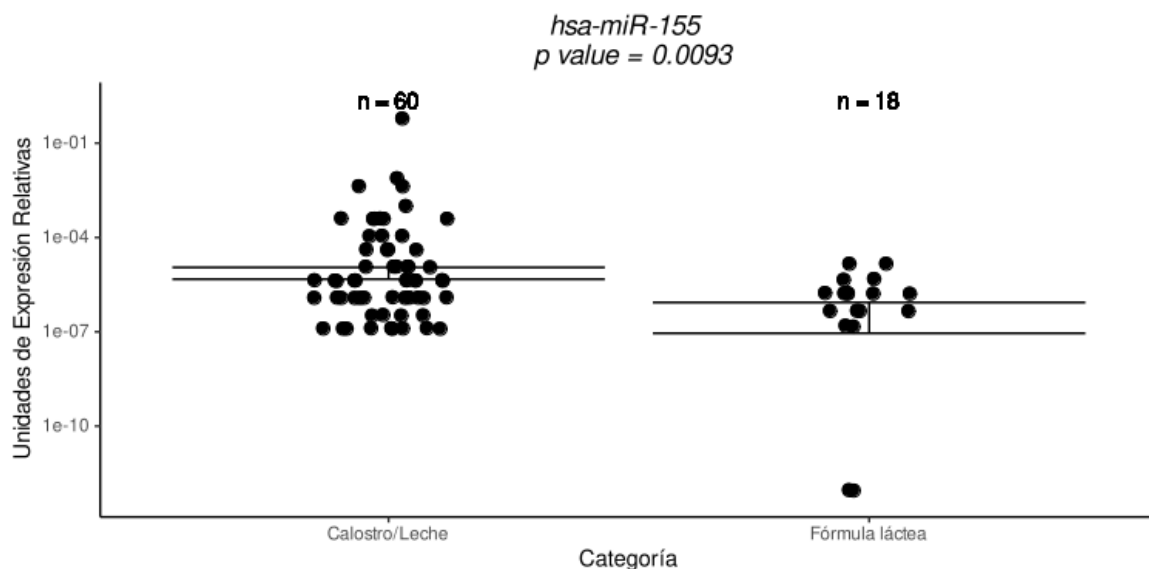


Figura 12: Niveles de expresión de miR-155 en calostro/leche y fórmula láctea. Se confirma la hipótesis alterna $H1: \eta_1 > \eta_2$, con un valor de $p = 0.0093$.

Y finalmente, en miR-200, se obtuvo un valor de p de 8×10^{-6} , lo cual implica de nuevo, diferencia significativa estadística (Fig. 13).

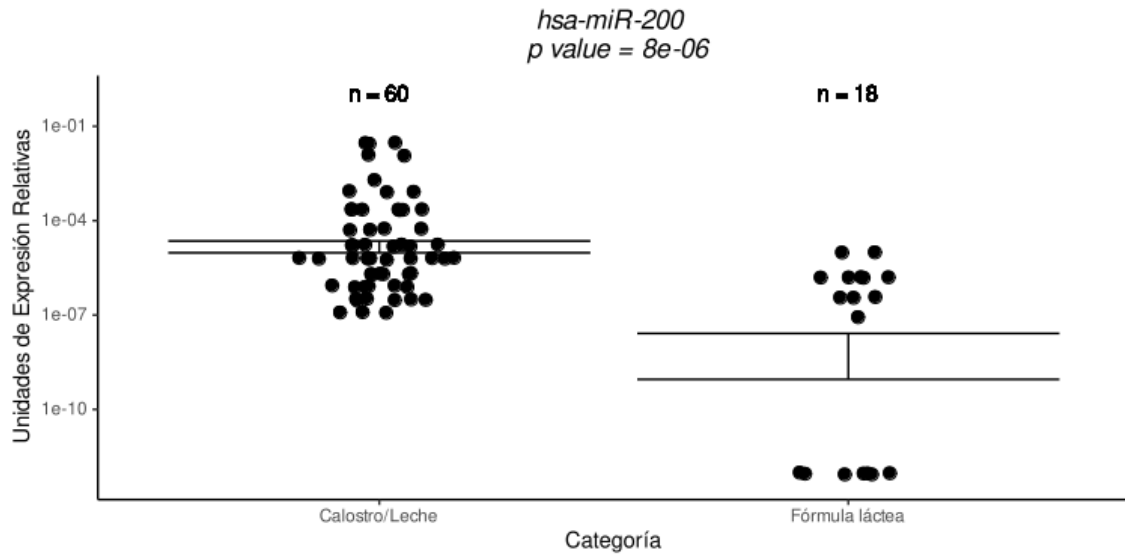


Figura 13: Niveles de expresión de miR-200 en calostro/leche y fórmula láctea. Se confirma la hipótesis alterna $H1: \eta_1 > \eta_2$, con un valor de $p = 8 \times 10^{-6}$.

Como ha podido observarse, en cada uno de los miRNAs evaluados se encontró una diferencia estadística significativa, además de que, tanto la distribución de los datos, como las barras de error estándar la media confirman también esta diferencia (Figs. 10, 11, 12 y 13).

Discusión

De acuerdo con el periodo de lactancia en que fueron tomadas las muestras, la mayoría de estas fueron colectadas 4 o menos días después del parto (Mosca, F., y Gianni, M. L., 2017), por lo que corresponderían a muestras de calostro, sin embargo, las propiedades organolépticas de la muestra no correspondieron en todos los casos a las esperadas de un calostro, que es distinto a la leche madura en volumen, apariencia y composición (Ballard, O. y Morrow, A. L., 2013), por lo que se consideró llamar al grupo de muestras analizado como calostro/leche.

La muestra analizada representa leche de madres mexicanas

Tomando en cuenta los datos antropométricos de las madres participantes en el estudio, la población estudiada tuvo un IMC promedio de 23.22, lo que corresponde a la categoría de normopeso. En la población predominaron madres con un parto vaginal o por cesárea de urgencia, además de que todos los neonatos de las madres estudiadas fueron a término por lo que el embarazo pudo completarse de manera correcta, de manera que esto no significa una variable adicional que pudiera interferir en la caracterización de los niveles de expresión de los miRNAs en las muestras. Por otra parte, los datos socioeconómicos de las madres reflejan a los de la mujer promedio que habita en la zona metropolitana del país.

Se recuperaron los miRNAs de interés mediante la extracción

La extracción de RNA reflejó una concentración baja (15.82 ng/ μ L) debido a que se utilizó un kit especializado para la extracción de miRNAs y estos tienen una talla molecular menor a la de los otros RNAs, la pureza de 1.72 refleja una buena pureza a pesar de la baja concentración de material genético calculada por fluorescencia. En cuanto al cDNA, se logró observar un amplicón de aproximadamente 25 pb, esto confirmó la presencia de las secuencias de miR-146, miR-148, miR-155 y miR-200 en las muestras de leche analizadas. Por otra parte, las curvas de disociación de la qPCR mostraron un pico definido indicando la especificidad de los oligos. Además, un experimento realizado previamente en

este grupo de trabajo confirmó mediante secuenciación la efectividad de los oligos utilizados en este estudio (Aguilera-Hernández, A., 2020).

Perfil de expresión de los miRNAs en calostro/leche

Para la cuantificación de los miRNAs por qPCR se utilizó a cel-miR-39 como control interno, de acuerdo con los resultados de PCR las muestras tuvieron un Ct cercano, lo que indica que este miRNA no fue afectado por el proceso de extracción y síntesis de cDNA, por lo que se considera que es un buen control interno para normalizar la cuantificación de los miRNAs de interés.

Al evaluar los perfiles de expresión de los miRNAs en calostro/leche se observó que tanto la dispersión como el error estándar de los miRNAs fue semejante, además de que el estadístico indicó que no se encontraron diferencias significativas. En un trabajo de Golan-Gerstl, R. y cols. (2017) se reportó que miR-148a estaba altamente expresado en 13 muestras de leche materna a un mes de lactancia; por otra parte, en un trabajo de Zhou, Q. (2012) en el que se analizaron miRNAs relacionados al sistema inmune en leche madura por secuenciación y se encontró un porcentaje similar entre miR-148a-3p, miR-146b-5p y miR-200a-3p. De cualquier forma, las muestras de este estudio fueron recolectadas en un tiempo más cercano al parto, y el número de muestras (60) considera la variación interespecífica de las madres y la expresión anormal de estos miRNAs, tanto a la alta como a la baja, podría reflejar un estado patológico, por ejemplo la sobreexpresión de miR-148 se ha asociado a la hipometilación en células T CD4+ en lupus (Pan, W., y cols, 2010), miR-146, por otra parte se ha encontrado expresado a la alta en infección de *Treponema pallidum*. De manera que, dado que las madres involucradas en este estudio fueron mujeres sanas, los resultados observados podrían reflejar los niveles de expresión de miRNAs en leche materna en condiciones de salud normales.

Por otra parte, mediante la prueba de Kruskal-Wallis tampoco se observaron diferencias en los niveles de expresión de miRNAs a distintos días de periodo de lactancia, pero si parece existir cierta tendencia al aumento en los

niveles de expresión de los miRNAs en el día 3. Existe la posibilidad de que, en este caso, la falta de diferencias detectable se deba a la existencia de una discrepancia muy grande en el número de muestras de cada grupo, siendo que la mitad correspondieron a un día después del parto y las demás estuvieron repartidas en el resto de los días, además, para explorar posibles diferencias en los niveles de expresión de miRNAs a diferentes días de lactancia, sería mucho más adecuado realizar un estudio longitudinal que explore la evolución en el perfil de expresión de miRNAs para poder responder con mayor claridad a esta pregunta. En un trabajo realizado por Wu, F. y cols. (2020) se comparó la expresión de otros miRNAs en muestras calostro y leche maduro, encontrándose en efecto diferencias en los niveles de los miRNAs que ellos estudiaron. Sin embargo, no se han encontrado estudios donde se busquen diferencias en periodos más cortos, siendo que durante los primeros días de la lactancia ocurren cambios drásticos en la comparación de la leche, por lo que la incógnita queda abierta.

Se detectó una mayor expresión de miRNAs inmunorreguladores en calostro/leche en comparación a la fórmula láctea

En el último análisis de este trabajo se buscaron diferencias en los niveles de expresión entre calostro/leche y fórmula láctea, encontrándose en cada uno de los miRNAs analizados que la expresión fue significativamente mayor en calostro/leche que en fórmula láctea, es destacable que en la fórmula láctea pudieron encontrarse miRNAs a pesar del procesamiento que implica su producción, como sea, esta expresión se ha reportado en estudios previos (Golan-Gerstl, y cols., 2017; Chen, X., y cols., 2010) además de que se sabe que los miRNAs son estables y resistentes a distintas condiciones adversas como pueden ser cambios de temperatura y pH brusco, además de la actividad de nucleasas (Tomé-Carneiro, J., y cols., 2018; Liao, Y., y cols., 2017). También cabe mencionar que las muestras utilizadas en este estudio fueron recolectadas a finales de 2017 y principios de 2018, por lo que han sido almacenadas por lo menos durante 3 años, mientras que las fórmulas lácteas fueron compradas, preparadas y

procesadas de inmediato; hasta el momento no se han encontrado reportes que discutan la estabilidad de los miRNAs a lo largo de periodos prolongados de tiempo y aunque el largo tiempo de almacenaje de las muestras podría suponer una limitación en este trabajo, es interesante observar que existe una mayor expresión de los miRNAs estudiados en calostro/leche, a pesar de la antigüedad de las muestras.

Esto es sustancial, porque con dichos resultados se afianza la importancia de la alimentación de leche materna en el infante, ya que el aporte de estas moléculas no puede ser sustituido del todo mediante la alimentación con fórmula láctea.

Limitaciones del estudio

Las muestras analizadas tuvieron una antigüedad de tres años y las condiciones en las que se realizó el trabajo no permitieron la colecta de más muestras de leche.

La resolución de los geles de agarosa utilizados en el trabajo dificultó la observación de los miRNAs estudiados.

No se tienen datos de secuenciación que confirmen la especificidad de los oligos en muestras de fórmula láctea, sin embargo, la similitud del 100% de las secuencias analizadas entre humano y vaca sugieren que la especificidad es la misma que en humano.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en un periodo de marzo a julio, menor a 6 meses, el corto tiempo del que se dispuso este trabajo impidió la realización de más pruebas para resolver las limitaciones previamente reportadas.

Conclusiones

De acuerdo con las características de la población estudiada, las muestras de leche analizadas en este estudio representan a la madre lactante promedio que habita en el área metropolitana del país.

La estandarización en el proceso de extracción de miRNAs en muestras de leche materna permite el análisis de estas moléculas en futuros estudios en este grupo de trabajo que indaguen sobre las fluctuaciones en los niveles de expresión de los miRNAs en diversas condiciones como pueden ser obesidad, síndrome metabólico, dietas específicas o incluso a lo largo del ciclo circadiano, entre muchas otras. Por ejemplo, a raíz de este trabajo sería interesante buscar diferencias en los niveles de expresión de los miRNAs en leche materna a lo largo de la lactancia con el fin de elucidar el aporte que estos miRNAs realizan al desarrollo del sistema inmune del neonato.

Se propone que futuros estudio sean realizados mediante un enfoque de carácter genómico como puede ser la secuenciación masiva, de esta manera puede caracterizarse el perfil de miRNAs en la leche materna de distintas poblaciones de interés, dado su importancia en la regulación post-transcripcional.

Por otra parte, puede concluirse que estos resultados suman evidencia al actual conocimiento que indica que la leche materna es un alimento irremplazable e indispensable para el correcto desarrollo del infante pues en condiciones en que la madre se encuentra en un buen estado de salud, este alimento tiene una composición de moléculas que es adecuada y personalizada para su hijo.

Referencias

Aguilar, C., Mano, M., & Eulalio, A. (2019). MicroRNAs at the Host-Bacteria Interface: Host Defense or Bacterial Offense. *Trends in microbiology*, 27(3), 206–218. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.011>

Aguilera-Hernández, A. (2020). Cuantificación de miRNAs relacionados al sistema inmune en leche materna y leche de fórmula. [Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Alivernini, S., Gremese, E., McSharry, C., Tolusso, B., Ferraccioli, G., McInnes, I. B., & Kurowska-Stolarska, M. (2018). MicroRNA-155-at the Critical Interface of Innate and Adaptive Immunity in Arthritis. *Frontiers in immunology*, 8, 1932. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01932>

Bauman, D. E., Mather, I. H., Wall, R. J., & Lock, A. L. (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of dairy science*, 89(4), 1235–1243. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72192-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72192-0)

Ballard, O., y 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>

Barile, L., y Vassalli, G. (2017). Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 174, 63–78. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.020>

Black A. (2012). Breastfeeding the premature infant and nursing implications. *Advances in neonatal care : official journal of the National Association of Neonatal Nurses*, 12(1), 10–11. <https://doi.org/10.1097/ANC.0b013e3182425ad6>

Boldin, M. P., Taganov, K. D., Rao, D. S., Yang, L., Zhao, J. L., Kalwani, M., Garcia-Flores, Y., Luong, M., Devrekanli, A., Xu, J., Sun, G., Tay, J., Linsley, P. S., & Baltimore, D. (2011). miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *The Journal of experimental medicine*, 208(6), 1189–1201. <https://doi.org/10.1084/jem.20101823>

Boix-Amorós, A., Collado, M. C., & Mira, A. (2016). Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. *Frontiers in microbiology*, 7, 492. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00492>

Chen, Q. Z., Luo, F., Lu, M. X., Li, N., Teng, Y., Huang, Q. L., Zhu, N., Wang, G. Y., Yue, M., Zhang, Y., Feng, Y., Xiong, H. R., & Hou, W. (2017). HTNV-induced upregulation of miR-146a in HUVECs promotes viral infection by modulating pro-inflammatory cytokine release. *Biochemical and biophysical research communications*, 493(1), 807–813. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.073>

Chen, X., Gao, C., Li, H., Huang, L., Sun, Q., Dong, Y., Tian, C., Gao, S., Dong, H., Guan, D., Hu, X., Zhao, S., Li, L., Zhu, L., Yan, Q., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2010). Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell research*, 20(10), 1128–1137. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.80>

Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., & Foti, M. (2019). Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6249. <https://doi.org/10.3390/ijms20246249>

Eriksen, K. G., Christensen, S. H., Lind, M. V., & Michaelsen, K. F. (2018). Human milk composition and infant growth. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 21(3), 200–206. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000466>

Fu, Y., Zhang, L., Zhang, F., Tang, T., Zhou, Q., Feng, C., Jin, Y., & Wu, Z. (2017). Exosome-mediated miR-146a transfer suppresses type I interferon response and facilitates EV71 infection. *PLoS pathogens*, 13(9), e1006611. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006611>

Golan-Gerstl, R., Elbaum Shiff, Y., Moshayoff, V., Schechter, D., Leshkowitz, D., & Reif, S. (2017). Characterization and biological function of milk-derived miRNAs. *Molecular nutrition & food research*, 61(10), 10.1002/mnfr.201700009. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700009>

Gonzalez-Martin, A., Adams, B. D., Lai, M., Shepherd, J., Salvador-Bernaldez, M., Salvador, J. M., Lu, J., Nemazee, D., & Xiao, C. (2016). The

microRNA miR-148a functions as a critical regulator of B cell tolerance and autoimmunity. *Nature immunology*, 17(4), 433–440. <https://doi.org/10.1038/ni.3385>

Gila-Diaz, A., Arribas, S. M., Algara, A., Martín-Cabrejas, M. A., López de Pablo, Á. L., Sáenz de Pipaón, M., & Ramiro-Cortijo, D. (2019). A Review of Bioactive Factors in Human Breastmilk: A Focus on Prematurity. *Nutrients*, 11(6), 1307. <https://doi.org/10.3390/nu11061307>

Halkein, J., Tabruyn, S. P., Ricke-Hoch, M., Haghikia, A., Nguyen, N. Q., Scherr, M., Castermans, K., Malvaux, L., Lambert, V., Thiry, M., Sliwa, K., Noel, A., Martial, J. A., Hilfiker-Kleiner, D., & Struman, I. (2013). MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation*, 123(5), 2143–2154. <https://doi.org/10.1172/JCI64365>

He, J., Zhao, J., Zhu, W., Qi, D., Wang, L., Sun, J., Wang, B., Ma, X., Dai, Q., & Yu, X. (2016). MicroRNA biogenesis pathway genes polymorphisms and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ*, 4, e2706. <https://doi.org/10.7717/peerj.2706>

Hong, L., Sharp, T., Khorsand, B., Fischer, C., Eliason, S., Salem, A., Akkouch, A., Brogden, K., & Amendt, B. A. (2016). MicroRNA-200c Represses IL-6, IL-8, and CCL-5 Expression and Enhances Osteogenic Differentiation. *PloS one*, 11(8), e0160915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160915>

Hu, W., Xu, B., Zhang, J., Kou, C., Liu, J., Wang, Q., & Zhang, R. (2020). Exosomal miR-146a-5p from *Treponema pallidum*-stimulated macrophages reduces endothelial cells permeability and monocyte transendothelial migration by targeting JAM-C. *Experimental cell research*, 388(1), 111823. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111823>

Huang, R. S., Hu, G. Q., Lin, B., Lin, Z. Y., & Sun, C. C. (2010). MicroRNA-155 silencing enhances inflammatory response and lipid uptake in oxidized low-density lipoprotein-stimulated human THP-1 macrophages. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 58(8), 961–967. <https://doi.org/10.231/JIM.0b013e3181ff46d7>

Josefowicz, S. Z., Wilson, C. B., & Rudensky, A. Y. (2009). Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 182(11), 6648–6652. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803320>

Keikha, M., Bahreynian, M., Saleki, M., & Kelishadi, R. (2017). Macro-and Micronutrients of Human Milk Composition: Are They Related to Maternal Diet? A Comprehensive Systematic Review. *Breastfeeding medicine : the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, 12(9), 517–527. <https://doi.org/10.1089/bfm.2017.0048>

Koh K. (2017). Maternal breastfeeding and children's cognitive development. *Social science & medicine* (1982), 187, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2017.06.012>

Lässer, C., Alikhani, V. S., Ekström, K., Eldh, M., Paredes, P. T., Bossios, A., Sjöstrand, M., Gabrielsson, S., Lötvall, J., & Valadi, H. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of translational medicine*, 9, 9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-9>

Liao, Y., Du, X., Li, J., & Lönnerdal, B. (2017). Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells. *Molecular nutrition & food research*, 61(11), 10.1002/mnfr.201700082. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700082>

Le Doare, K., Holder, B., Bassett, A., & Pannaraj, P. S. (2018). Mother's Milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity. *Frontiers in immunology*, 9, 361. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00361>

Lönnerdal B. (2019). Human Milk MicroRNAs/Exosomes: Composition and Biological Effects. *Nestle Nutrition Institute workshop series*, 90, 83–92. <https://doi.org/10.1159/000490297>

Lukasik, A., & Zielenkiewicz, P. (2014). In silico identification of plant miRNAs in mammalian breast milk exosomes--a small step forward?. *PloS one*, 9(6), e99963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099963>

McGuire, M. K., & McGuire, M. A. (2015). Human milk: mother nature's prototypical probiotic food?. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md.), 6(1), 112–123. <https://doi.org/10.3945/an.114.007435>

Mosca, F., & Gianni, M. L. (2017). Human milk: composition and health benefits. *La Pediatria medica e chirurgica : Medical and surgical pediatrics*, 39(2), 155. <https://doi.org/10.4081/pmc.2017.155>

Nahid, M. A., Satoh, M., & Chan, E. K. (2011). Mechanistic role of microRNA-146a in endotoxin-induced differential cross-regulation of TLR signaling. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 186(3), 1723–1734. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002311>

O'Connell, R. M., Rao, D. S., & Baltimore, D. (2012). microRNA regulation of inflammatory responses. *Annual review of immunology*, 30, 295–312. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075013>

Otsuka, M., Jing, Q., Georgel, P., New, L., Chen, J., Mols, J., Kang, Y. J., Jiang, Z., Du, X., Cook, R., Das, S. C., Pattnaik, A. K., Beutler, B., & Han, J. (2007). Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity*, 27(1), 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.014>

Organización Mundial de la Salud. (2002) Salud de la madre, el recién nacido, del niño y del adolescente . Estrategia Mundial para la Alimentación del Lactante y del Niño Pequeño. Consultado el 1 de nov de 2020 de: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9243562215.pdf>

Pan, W., Zhu, S., Yuan, Sattari, M., Serwint, J. R., & Levine, D. M. (2019). Maternal Implications of Breastfeeding: A Review for the Internist. *The American journal of medicine*, 132(8), 912–920. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.02.021>

Pedersen, I., & David, M. (2008). MicroRNAs in the immune response. *Cytokine*, 43(3), 391–394. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.016>

Sattari, M., Serwint, J. R., & Levine, D. M. (2019). Maternal Implications of Breastfeeding: A Review for the Internist. *The American journal of medicine*, 132(8), 912–920. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.02.021>

Sayres, S., & Visentin, L. (2018). Breastfeeding: uncovering barriers and offering solutions. *Current opinion in pediatrics*, 30(4), 591–596. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000647>

M., Cui, H., Wang, L., Luo, X., Li, J., Zhou, H., Tang, Y., & Shen, N. (2010). MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(12), 6773–6781. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904060>

Shi, L., Zhang, S., Wu, H., Zhang, L., Dai, X., Hu, J., Xue, J., Liu, T., Liang, Y., & Wu, G. (2013). MiR-200c increases the radiosensitivity of non-small-cell lung cancer cell line A549 by targeting VEGF-VEGFR2 pathway. *PloS one*, 8(10), e78344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078344>

Sonkoly, E., Ståhle, M., & Pivarcsi, A. (2008). MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Seminars in cancer biology*, 18(2), 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.01.005>

Stower H. (2019). The breast milk microbiome. *Nature medicine*, 25(4), 541. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0427-1>

Tafrihi, M., & Hasheminasab, E. (2019). MiRNAs: Biology, Biogenesis, their Web-based Tools, and Databases. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*, 8(1), 4–27. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180827111633>

Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., & Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12481–12486. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103>

Tang, X., Wu, F., Fan, J., Jin, Y., Wang, J., & Yang, G. (2018). Posttranscriptional Regulation of Interleukin-33 Expression by MicroRNA-200 in

Bronchial Asthma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(7), 1808–1817. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.04.016>

Tam W. (2001). Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene*, 274(1-2), 157–167. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00612-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00612-6)

Togo, A., Dufour, J. C., Lagier, J. C., Dubourg, G., Raoult, D., & Million, M. (2019). Repertoire of human breast and milk microbiota: a systematic review. *Future microbiology*, 14, 623–641. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0317>

Tomé-Carneiro, J., Fernández-Alonso, N., Tomás-Zapico, C., Visioli, F., Iglesias-Gutierrez, E., & Dávalos, A. (2018). Breast milk microRNAs harsh journey towards potential effects in infant development and maturation. Lipid encapsulation can help. *Pharmacological research*, 132, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.04.003>

Towler, B. P., Jones, C. I., & Newbury, S. F. (2015). Mechanisms of regulation of mature miRNAs. *Biochemical Society transactions*, 43(6), 1208–1214. <https://doi.org/10.1042/BST20150157>

van Herwijnen, M., Driedonks, T., Snoek, B. L., Kroon, A., Kleinjan, M., Jorritsma, R., Pieterse, C., Hoen, E., & Wauben, M. (2018). Abundantly Present miRNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles Are Conserved Between Mammals. *Frontiers in nutrition*, 5, 81. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.000>

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötval, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>

Vigorito, E., Perks, K. L., Abreu-Goodger, C., Bunting, S., Xiang, Z., Kohlhaas, S., Das, P. P., Miska, E. A., Rodriguez, A., Bradley, A., Smith, K. G., Rada, C., Enright, A. J., Toellner, K. M., MacLennan, I. C., & Turner, M. (2007). microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*, 27(6), 847–859. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.10.009>

Westerfield, K. L., Koenig, K., & Oh, R. (2018). Breastfeeding: Common Questions and Answers. *American family physician*, 98(6), 368–373.

Wu, F., Zhi, X., Xu, R., Liang, Z., Wang, F., Li, X., Li, Y., & Sun, B. (2020). Exploration of microRNA profiles in human colostrum. *Annals of translational medicine*, 8(18), 1170. <https://doi.org/10.21037/atm-20-5709>

Wu, W., & Li, Y. (2018). Lung injury caused by paraquat poisoning results in increased interleukin-6 and decreased microRNA-146a levels. *Experimental and therapeutic medicine*, 16(1), 406–412. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6153>

Yang, K., He, Y. S., Wang, X. Q., Lu, L., Chen, Q. J., Liu, J., Sun, Z., & Shen, W. F. (2011). MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4. *FEBS letters*, 585(6), 854–860. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.009>

Zárate-Neira, L. Á., Sánchez-Barbosa, S., Pedroza-Torres, A., Reséndiz-Mora, A., Wong, C., Baeza, I., Pérez-Plasencia, C., & Wong-Baeza, C. (2017). Dysregulation of miR-155-5p and miR-200-3p and the Anti-Non-Bilayer Phospholipid Arrangement Antibodies Favor the Development of Lupus in Three Novel Murine Lupus Models. *Journal of immunology research*, 2017, 8751642. <https://doi.org/10.1155/2017/8751642>

Zempleni, J., Aguilar-Lozano, A., Sadri, M., Sukreet, S., Manca, S., Wu, D., Zhou, F., & Mutai, E. (2017). Biological Activities of Extracellular Vesicles and Their Cargos from Bovine and Human Milk in Humans and Implications for Infants. *The Journal of nutrition*, 147(1), 3–10. <https://doi.org/10.3945/jn.116.238949>

Zeng, B., Chen, T., Luo, J. Y., Zhang, L., Xi, Q. Y., Jiang, Q. Y., Sun, J. J., & Zhang, Y. L. (2020). Biological Characteristics and Roles of Noncoding RNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md.), nmaa124. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa124>

Zheng, B., Yin, W. N., Suzuki, T., Zhang, X. H., Zhang, Y., Song, L. L., Jin, L. S., Zhan, H., Zhang, H., Li, J. S., & Wen, J. K. (2017). Exosome-Mediated miR-155 Transfer from Smooth Muscle Cells to Endothelial Cells Induces Endothelial Injury

and Promotes Atherosclerosis. *Molecular: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(6), 1279–1294. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.031>

Zhou, Q., Li, M., Wang, X., Li, Q., Wang, T., Zhu, Q., Zhou, X., Wang, X., Gao, X., & Li, X. (2012). Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *International journal of biological sciences*, 8(1), 118–123. <https://doi.org/10.7150/ijbs.8.118>

–fin–de–texto–