



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

"Transmisión vertical de los miRNAs de la leche materna, al neonato  
durante el amamantamiento"

Tesis

Que presenta

LIC. EN GEN. NOEMÍ DEL SOCORRO LÁZARO PÉREZ

para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

en la Especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

**Director de Tesis**

Jaime García Mena

Ciudad de México

septiembre, 2024

## Agradecimiento

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



Para la realización de este trabajo se recibió apoyo del CONAHCYT-163235 INFR-2011-01 y CONACHYT FORDECYT-PRONACES/6669/2020\_Programa Presupuestario F003-Ciencia de Frontera 2019.

Durante el desarrollo de este trabajo Noemí del Socorro Lázaro Pérez fue becaria de Maestría del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) beca 1227574 durante el período de septiembre del año 2022 a agosto del año 2024.

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **ASESORES**

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

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

Dra. Claudia Pérez Cruz  
Departamento de Farmacología  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

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

Dr. María Luisa Pizano Zárate  
Coordinación de Nutrición y Bioprogramación  
Instituto Nacional de Perinatología  
Secretaría de Salud

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología por la beca de Maestría con el número de registro 1227574 que me proporcionó y por los fondos otorgados para este proyecto. Agradezco al Cinvestav por el apoyo otorgado para los cursos curso de especialización, los congresos y el apoyo extraordinario para la realización de esta tesis.

Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia técnica con los reactivos y a la Lic. Viridiana Rosas Ocegueda por su apoyo administrativo.

Agradezco a todos y cada uno de los miembros del Laboratorio Cer0, por el conocimiento y experiencias compartidas a lo largo de este tiempo en el que formé parte de él. Un agradecimiento especial a Juan Manuel, compañero y amigo, con quien trabajé mano a mano y quien me compartió su conocimiento en el área de la bioinformática.

Al Dr. Jaime García Mena, por permitirme ser parte de su laboratorio, por compartir su experiencia y hacer más agradable los días en el Cinves.

A la Dra. Claudia Pérez Cruz y al Dr. Bulmaro Cisneros Vega, por sus comentarios y aportaciones realizadas durante las evaluaciones.

De la misma forma, un agradecimiento a mi familia por apoyarme siempre.

*Gracias*

## RESUMEN

La leche materna es considerada el estándar de oro para la nutrición infantil, además de reducir la incidencia de enfermedades gracias a que contiene componentes inmunológicos, oligosacáridos, lípidos, hormonas y vesículas extracelulares que acarrean moléculas bioactivas las cuales sobreviven de la digestión gástrica y pancreática, algunos de estos componentes son: largos no codificantes, RNA interferente corto, RNA circular y miRNAs, estos últimos participan en el control de la expresión génica e influyen en la inmunidad innata y adaptativa. En este trabajo buscamos proporcionar evidencia de la transmisión vertical de los miRNAs de la leche al neonato utilizando la leche materna como vehículo. Se seleccionaron 28 binomios (calostro y copro de neonato), a partir de RNA total extraído se determinó la presencia de los miRNAs, miR21 y miR146 en ambas muestras por qPCR. Se realizó un análisis *in silico* utilizando secuencias de miRNAs de bases de datos, estos datos se obtuvieron a partir de muestras de leche de madres con un periodo de dos meses de lactancia, las muestras fueron tomadas el mismo día, antes y después de alimentar al lactante. Los resultados muestran que, los miRNAs let-7f-5p, miR-181a-5p, miR-148a-3p fueron los más abundantes en ambas muestras, mientras que, los análisis de expresión diferencial, Deseq, Aldex y degR, indican que si existen diferencias en la composición de miRNAs entre las muestras antes y después de alimentar al neonato.

Breast milk is considered the gold standard for infant nutrition, in addition to reducing the incidence of diseases thanks to the fact that it contains immunological components, oligosaccharides, lipids, hormones and extracellular vesicles that carry bioactive molecules which survive gastric and pancreatic digestion, some of these components are: long non-coding RNA, short interfering RNA, circular RNA and miRNAs, the latter participate in the control of gene expression and influence innate and adaptive immunity. In this work we seek to provide evidence of the vertical transmission of miRNAs from milk to the newborn using breast milk as a vehicle. 28 binomials (colostrum and newborn feces) were selected; from the extracted total RNA, the presence of miRNAs, miR21 and miR146 in both samples was determined by qPCR. An *in silico* analysis was performed using miRNA sequences from databases, these data were obtained from milk samples of mothers with a period of two months of lactation, the samples were taken on the same day, before and after feeding the infant. The results show that the miRNAs let-7f-5p, miR-181a-5p, miR-148a-3p were the most abundant in both samples, while the differential expression analyses, Deseq, Aldex and degR, indicate that there are differences in the composition of miRNAs between the samples before and after feeding the newborn.

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Importancia del amamantamiento	1
Leche humana	2
Calostro	2
Leche transicional	3
Leche Madura	3
Vesículas extracelulares de la leche humana	3
microRNAs	4
Glándula mamaria	5
Lactogénesis	5
Intestino del Neonato	6
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
GENERAL	8
ESPECÍFICO	8
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>9</b>
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>10</b>
Obtención de las muestras	10
Criterios de inclusión y exclusión	10
Extracción del RNA de bajo peso molecular de muestras de calostro humano y de copro de neonato	11
Preparación de la muestra	11
Extracción de RNA de bajo peso molecular usando el kit mirVana	11
• Lysis	11
• Extracción Orgánica	11
• Filtrado y lavado	12
• Elución y Almacenamiento:	12
Cuantificación de RNA de bajo peso molecular	12
Detección de miRNAs en las muestras por qPCR	13
Realización de cDNA de las muestras	13
qPCR (Real Time PCR)	13
Cuantificación del RNA Integrity Number (RIN)	14
Secuenciación de miRNAs extraídos de las muestras de Leche y copro de Neonato.	15
Síntesis de Universal cDNA y preparación de librerías de miRNA	17

Ligación del 3´ _____	17
Ligación del 5´ _____	18
Transcripción Reversa _____	18
Preparación de perlas QIAseq miRNA NGS (perlas QMN) _____	19
Limpieza de ADNc _____	19
Amplificación de bibliotecas mediante índices _____	20
Control de calidad presecuenciación de las bibliotecas de miRNA _____	20
Determinación de la concentración de la biblioteca y la asignación de lectura por muestra _____	20
Preparación para secuenciación _____	20
<b>Análisis <i>In silico</i> de secuencias de miRNAs _____</b>	<b>21</b>
Evaluación de la calidad de las lecturas _____	21
_____	23
Recorte y Filtrado _____	24
Ensamblado de las secuencias _____	26
Mapeo y conteo de lecturas _____	26
Análisis utilizando lenguaje R _____	26
<b>RESULTADOS _____</b>	<b>32</b>
Extracción e integridad y concentración _____	32
Detección de miRNAs en las muestras de binomios por qPCR _____	33
Fraccionamiento electroforético de muestras con RNA extraído _____	34
Resultados de electroforesis capilar por BioAnalyzer _____	35
HeatMap realizado con secuencias de miRNAs obtenidos de bases de datos _____	37
miRNAs más abundantes en las muestras _____	37
Análisis diferencial de los miRNAs en muestras de Leche _____	39
DESeq _____	39
ALDEX _____	39
DEGER _____	39
<b>DISCUSIÓN _____</b>	<b>43</b>
Detección de miRNAs en las muestras de binomios por qPCR _____	43
Análisis <i>in silico</i> de secuencias de miRNAs obtenidas de bases de datos _____	43
miRNAs más abundantes en las muestras de leche _____	44
Análisis Diferencial de la Expresión de los miRNAs en muestras de Leche antes y después de la alimentación _____	45
<b>CONCLUSIÓN _____</b>	<b>48</b>
<b>PERSPECTIVAS _____</b>	<b>49</b>
<b>APÉNDICE _____</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCIAS _____</b>	<b>52</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Binomios (Calostro materno y copro de neonatos) seleccionado para secuenciación.	32
<b>Tabla 2:</b> Resultados de qPCR en la identificación de miRNAs en muestras de calostro y copro de Neonato.	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Gel de agarosa al 2%, en el que se observan los pesos moleculares de los productos de qPCR.	34
<b>Figura 2:</b> Resultados de electroforesis capilar de muestras de calostro y copro de Neonato realizada por BioAnalyzer.	36
<b>Figura 3:</b> Heat-Map demostrando los patrones de relación y expresión de miRNAs en muestras de Leche Before y After alimentación.	37
<b>Figura 4:</b> El gráfico de barras muestra el patrón de expresión de los 15 miRNAs más abundantes en las muestras de Leche Before (Azul) y After (Naranja).	38
<b>Figura 5:</b> Resultados de expresión diferencial utilizando DESeq.	40
<b>Figura 6:</b> Resultados de expresión diferencial utilizando ALDEx muestras Before en Azul, muestras After en Naranja.	41
<b>Figura 7:</b> Resultados de análisis de expresión diferencial utilizando degeR.	42



# INTRODUCCIÓN

## **Importancia del amamantamiento**

El amamantamiento es una de las prácticas más antiguas y útiles de la raza humana, crucial para el desarrollo óptimo de recién-nacidos (Santiago-Cruz et al., 2019) ya que por años se ha reconocido por su importante intervención en la reducción de la mortalidad de infantes (Huffman et al., 2001). La leche materna humana es considerada el estándar de oro para la nutrición de los infantes, y ha sido reconocida por el World Health Organization (WHO) y el United Nations Children's Fund (UNICEF) como la nutrición ideal para los bebés recién nacidos. Recomendando el amamantamiento exclusivo durante los primeros 6 meses de edad con una continuación de una apropiada alimentación complementaria hasta los dos años de edad (Garwolińska et al., 2018).

El amamantamiento ha reducido la incidencia de enfermedades infecciones, malnutrición, alérgicas y otras condiciones patológicas relacionadas a la autoinmunidad o inmunidad desregulada, enfermedad de Crohn's, colitis ulcerosa, diabetes mellitus dependiente de insulina, obesidad, algunos linfomas. (Garofalo, 2010; Pillay & Davis, 2024).

La leche materna es la mejor opción de alimentación infantil desde el punto de vista nutricional. El importante papel del amamantamiento en la reducción de mortalidad es debido a su composición nutricional como factores bioactivos no nutritivos como células, agentes anti-infecciosos y anti-inflamatorios, factores de crecimiento y prebióticos (Ballard & Morrow, 2013). Los cuales contribuyen de manera sinérgica, al crecimiento, al desarrollo de órganos y a la reparación de tejidos, protección contra la inflamación y las infecciones, mejora de las barreras mucosas, maduración y tolerancia inmunitaria, neurodesarrollo, regulación del metabolismo y la composición corporal, regulación del sistema vascular, prevención de la anemia, adquisición y desarrollo de la microbiota y muchos otros (Rodríguez et al., 2021).

Los componentes bioactivos de la leche humana viene de diferentes fuentes; algunas son producidas por células acarreadas con la leche mientras que otras

acarreadas del suero de la madre y llevadas al epitelio mamario por receptor-mediated transport (Ballard & Morrow, 2013) . Recientes estudios han apoyado la idea de que la leche humana no es estéril y es la principal y una continua fuente de colonización de bacterias en el intestino del neonato (Kapourchali & Cresci, 2020).

### **Leche humana**

La leche es un alimento muy complejo que es producido en las glándulas mamarias, y que proporciona al bebé nutrientes esenciales para su óptimo crecimiento, al igual que un conjunto de moléculas de inmunidad que ayudan a la supervivencia a corto plazo e información epigenética a largo plazo que influye en la salud del futuro adulto, siendo considerada como un agente terapéutico (Kaeffer, 2023; Witkowska-Zimny & Kaminska-El-Hassan, 2017). La leche es una secreción muy compleja que surge de vías secretorias trans y paracelular. La vía transcelular es dividida en cuatro mecanismos secretorios: primero, exocitosis; segundo, secreción de glóbulos de grasa de leche; tercero; secreción de iones; cuarto; pinocitosis-exocitosis. Mientras que la vía paracelular resulta en difusión limitada de sangre (Pang & Hartmann, 2007; Pillay & Davis, 2024).

La composición de la leche humana es dinámica y varía por factores diversos como no contar con un lactante, diurnalmente, con la sobre-lactación, entre madres y poblaciones, incluyendo también factores maternos, ambientales y la extracción y manejo de la leche (Ballard & Morrow, 2013). Además, la composición de la leche varía de acuerdo con la gestación, tiempo de postparto e incluso durante el mamo (Truchet & Honvo-Houéto, 2017).

### **Calostro**

El calostro es el primer fluido producido por las madres después del parto, el cual es diferente en volumen, apariencia y composición, es rico en componentes inmunológicos, así como IgA secretora que ayuda a proteger al bebé de infecciones (Jozsa & Thistle, 2024). Además, contiene componentes como lactoferrina, leucocitos, oligosacáridos, nucleótidos, lípidos, hormonas, factores de desarrollo como factores de crecimiento epidérmico, de la misma manera contiene relativamente bajas concentraciones de lactosa, indicando que su función primaria

es ser inmunológica y trófica antes que nutricional, por lo cual es el alimento ideal para los recién nacidos (Ballard & Morrow, 2013; Palmeira & Carneiro-Sampaio, 2016).

### **Leche transicional**

La leche producida entre las etapas de calostro y leche madura es leche de transición, cambiando en composición de calostro a leche madura. La fase de transición es aproximadamente de 7 a 10 días posparto a 2 semanas posparto. La concentración de inmunoglobulinas y proteína total disminuye, mientras que la lactosa, la grasa y el contenido calórico total aumentan, las vitaminas hidrosolubles aumentan hasta los niveles de la leche madura y las vitaminas liposolubles disminuyen (Lawrence, 2022).

### **Leche Madura**

La leche madura comienza a secretarse después de aproximadamente 10 días post-parto cuando la lactancia está completamente establecida, el contenido de grasa de la leche cambia con el tiempo y en el caso de la leche madura tiene, en promedio un 3.6% de grasa, lo que puede variar según la hora del día, la dieta, la duración de la lactancia e incluso el tiempo entre tomas (Christian et al., 2021).

### **Vesículas extracelulares de la leche humana**

La leche humana contiene abundantes cantidades de vesículas extracelulares (EVs) muy heterogéneas en composición y tamaño en un rango de ~50 nm a >1  $\mu$  con mayormente <200 nm, quienes son originadas de múltiples fuentes celulares y contienen diferentes moléculas bioactivas como proteínas funcionales, ácidos nucleicos y lípidos. A su vez en la leche materna también están presentes RNA no-codificantes incluyendo largos no codificantes (lncRNA), RNA interfente corto (siRNA), ARN que interactúa con piwi (piRNA), RNA circular (circRNA) y ARNt fragmentados, mRNAs y micro-RNAs (miRNAs) los cuales son acarreados en la leche después de la exocitosis de los cuerpos multivesiculares (MVBs) de los que las EVs forman parte (Tingö et al., 2021; van Herwijnen et al., 2016).

Estudios sugieren que las EVs puede contribuir a la transferencia vertical de la microbiota comensal de las madres a los infantes, y se ha proporcionado evidencia de la supervivencia de la digestión gástrica y pancreática de los miRNAs dentro de las vesículas extracelulares, respaldando la hipótesis de que las cargas de EV se entregan adecuadamente a las células intestinales donde pueden ejercer sus funciones, como en su influencia en la inmunidad mucosa, incrementar la diversidad del microbioma intestinal y desarrollo de los neonatos (Notarbartolo et al., 2022; O'Reilly et al., 2020). Estudios han indicados que los miRNAs de la leche materna probablemente influya en la inmunidad innata y adaptativa a nivel celular y molecular (con impacto en IL-6 e IL-10, receptor tipo Toll, señalización de NF- $\kappa$ B y comunicación, activación y maduración de células inmunitarias). Además, se infiere que los miRNAs regulan genes objetivo basado en la expresión génica (Melnik et al., 2021).

### **microRNAs**

El control de la expresión génica ha sido estudiado y se ha identificado a los miRNAs, moléculas pequeñas de RNA no codificantes (18-24 nucleótidos), están implicadas en la regulación transcripcional y post-transcripcional de la expresión de los genes inhibiendo la transcripción génica. El silenciamiento de la expresión génica por miRNAs se lleva a cabo inhibiendo la traducción del RNA a proteínas o potenciando la degradación del miRNAs (Ahmed et al., 2017).

La biogénesis de los miRNAs explica que son sintetizados en el núcleo, son expresados y funcionan en el citoplasma. Sin embargo, existe evidencia sobre la presencia de miRNAs extracelularmente y que circulan en fluidos corporales (S. Liu et al., 2016). Se ha reportado la presencia de altos niveles de miRNAs en plasma, orina, heces, saliva, fluido seminal, lágrimas, fluido cerebroespinal y más recientemente en la leche materna (LM)(Alsaweed et al., 2015; Weber et al., 2010). Se sugiere que los miRNAs de la leche humana se originan principalmente en el epitelio mamario, con una contribución menor de la circulación materna (Liao et al., 2016).

La leche humana es particularmente rica en miRNAs, los cuales se ha propuesto que están relacionados con la protección y desarrollo infantil. Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional, modulando importantes funciones celulares como el ciclo celular, metabolismo, proliferación, diferenciación, apoptosis, y respuesta inmune (Lyons et al., 2020). La leche materna es una de las fuentes más ricas de miRNAs ya que se pueden encontrar ~1400 miRNAs y pueden ser aislados de tres fracciones: la leche, de las células y de la leche desnatada (Alsaweed et al., 2015).

### **Glándula mamaria**

Para que ocurra la lactancia materna, la glándula mamaria debe pasar por una serie de cambios de desarrollo que comienzan en el útero y continúan hasta el nacimiento. Durante este periodo de tiempo, la glándula mamaria se ramifica y se alarga formando una red secretora de leche en pleno funcionamiento que se activa después del parto y proveer un soporte nutricional al recién nacido (Lyons et al., 2020).

La glándula mamaria (MG) es un órgano exocrino dinámico que puede repetir ciclos de crecimiento, diferenciación funcional y regresión, vinculado con procesos reproductivos (Truchet & Honvo-Houéto, 2017). Los cambios anatómicos y fisiológicos ocurren en el seno maduro como resultado de niveles elevados de hormonas durante el embarazo. El epitelio alveolar aumenta de tamaño y comienza la secreción de componentes de la leche en respuesta a los niveles elevados de estrógeno tan pronto como la ovulación (Alex et al., 2020)

### **Lactogénesis**

La lactogénesis es el proceso de desarrollo de la capacidad de secretar leche e implica la maduración de las células alveolares. Tiene lugar en 2 etapas: iniciación secretora y activación secretora (Pillay & Davis, 2024).

La diferenciación secretora, también conocida como lactogénesis I, comenzando en la semana 20 del embarazo, cuando las glándulas mamarias comienzan a secretar una pequeña cantidad de leche. Este periodo dura aproximadamente hasta

el segundo o tercer día después del nacimiento y continúa hasta que se produce la lactancia completa después del parto (Farah et al., 2021).

El estado II de lactogénesis, o activación secretoria, es definida como la iniciación de una secreción de leche copiosa. Este proceso se ha reportado en un rango de las primeras horas después del parto alrededor de los 7 días postparto (Nommsen-Rivers et al., 2012). Con la extracción de la placenta, la rápida caída de la progesterona, la presencia de niveles elevados de prolactina, cortisol e insulina, estimulan esta etapa; La mayoría de las mujeres experimentan hinchazón de los senos junto con una producción abundante de leche (Pillay & Davis, 2024).

### **Intestino del Neonato**

El intestino de infantes neonatos, especialmente los prematuros son hipersensibles a estímulos proinflamatorios y vulnerables a patógenos. La leche humana contiene moléculas inmunomoduladoras que los protegen de procesos proinflamatorios, leucocitos y glicanos, los cuales promueven la colonización por simbiosis y que inhiben patógenos específicos (Newburg & Walker, 2007). El epitelio intestinal establece una barrera selectivamente permeable que favorece la absorción de nutrientes y la secreción de desechos, al tiempo que evita la intrusión de materiales lumenales. Los epitelios intestinales desempeñan un papel central en la regulación de las interacciones entre el sistema inmunitario de la mucosa y los contenidos lumenales, que incluyen antígenos dietéticos, un microbioma intestinal diverso y patógenos (Buckley & Turner, 2018).

La leche materna ha sido conocida por proteger a los infantes de infecciones y al desarrollo integral de los mismos. Varios estudios que perfilaron los ARNm y miARN de la leche materna encontraron que pueden ser absorbidos por las células y provocar efectos funcionales in vitro alterando la expresión de proteínas en la superficie de la mucosa neonatal, lo que impacta en el desarrollo del sistema inmunológico del bebé (Le Doare et al., 2018).

De la misma manera, los miRNAs encontrados en las heces han sido implicados en la comunicación intercelular y ha sugerido que los miRNAs producidos en las

células epiteliales del intestino participan en la formación de la microbiota intestinal y pueden afectar el crecimiento bacteriano (Moloney et al., 2018).

## **ANTECEDENTES**

Se han utilizado metodologías diferentes para el aislamiento de EVs e indicando de esta manera la existencia de dos tipos: como exomas y microvesículas (Admyre et al., 2007). Estos estudios también han reportado que las EVs contienen moléculas como proteínas, miRNAs, metabolitos, etc. (Carr et al., 2021).

Algunos miRNAs son reguladores clave en el metabolismo de lípidos de la leche, con funciones importantes en la oxidación de ácidos grasos, homeostasis del colesterol y como reguladores de la lipogénesis. Los miRNAs pueden ser usados en el tratamiento de enfermedades, como arterioesclerosis y dislipidemia, además de ser ligados al control de crecimiento, apoptosis, modificaciones epigenéticas, diferenciación de células madres y el incremento o decremento de cáncer (Yi & Kim, 2021). En el sistema nervioso central (SNC), se sabe que los miRNAs influyen en diversas etapas del neurodesarrollo, incluida la diferenciación celular, la proliferación y la sinaptogénesis (Ponnusamy & Yip, 2019).

De la misma manera, Golan y cols., (Golan-Gerstl et al., 2017) ha perfilado los miRNAs en leche humana mediante secuenciación de próxima generación y qPCR, mostrando como resultados que, miR-148a-3p, miR-22-3p, miR-200a-3p, miR-146b-5p, miR-30d-5p, let-7a-5p, miR-30a-5p, let-7f-5p, let-7b-5p, and miR-21-5p son los más abundantes en este fluido corporal. De la misma forma, Vélez-Ixta y cols., (Vélez-Ixta et al., 2022) validaron las hipótesis de que los miRNAs miR-146b-5p, miR148a-3p, miR155-5p, mir181a-5p, y mir200a-3p mediante qPCR son expresados en calostro/leche con un nivel más alto que en formula láctea para infantes.

De igual forma, en una investigación se encontró que los miRNAs altamente expresados en la leche son principalmente miRNAs relacionados con el sistema inmunitario, como miR-146a, miR-200 y miR-30. Además, muestran que miRNA-148a se expresa altamente en la leche humana el cual exhibe una actividad

supresora de tumores al regular la expresión de genes como DNMT1, DNMT3, ERBB3 y ROCK1, que intervienen en el desarrollo, proliferación y metástasis tumorales (Golan-Gerstl et al., 2017). Alsaweed y cols., (Alsaweed et al., 2016), lograron perfilar 681 miRNAs de leche madura, determinando de esta manera la composición de miRNAs de las células y fracción de grasa de la leche.

De la misma manera se ha estudiado la transmisión de los componentes de la leche de la madre a sus hijos, indicando la transferencia bacteriana a través del amamantamiento (Kapourchali & Cresci, 2020).

## **HIPÓTESIS**

Existe transmisión vertical de miRNAs de la madre al Neonato por medio de la leche materna.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Demostrar que existe transmisión vertical de miRNAs de la madre al neonato por medio de la Leche Materna (LM).

### **ESPECÍFICO**

- Seleccionar la muestra de binomios madre-neonato según los criterios de inclusión.
- Determinar la presencia de miRNAs mediante qPCR en calostro y el copro de Neonato.
- Caracterizar la diversidad de miRNAs en calostro y en el copro del neonato de los binomios por secuenciación masiva.
- Determinar la semejanza de la diversidad de los miRNAs de calostro y de copro de neonatos.



## **JUSTIFICACIÓN**

El demostrar la presencia de miRNAs en la leche humana y la transmisión vertical de madre a neonatos es importante puesto los miRNAs han sido involucrados en varios procesos biológicos y de expresión o represión genética, asociado a una mayor sobrevivencia y salud en los recién nacidos.

Si bien, ya se han estudiado los miRNAs en la leche humana, no se ha llevado a cabo una determinación de la posible transmisión de miRNAs de la leche materna al neonato. Más aún, no hay registros de este tipo de estudios en una población mexicana. Los datos generados nos darán información génica y la posible relación de los miRNAs presentes en nuestra población en comparación con otras poblaciones y distintos estilos de vida.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se realizó un estudio observacional y longitudinal con mujeres lactantes y neonatos mexicanos. Este estudio fue aprobado por el Comité de Investigación, Bioseguridad y Ética del hospital Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” con el número de registro INPER-DG-000419-2019\_2018-1-172. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado para la recolección de muestras y toma de datos de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

### **Obtención de las muestras**

Se obtuvieron 28 muestras de binomios sanos: muestras de calostro humano y copro de neonato. Todas las muestras se tomaron en condiciones estériles dentro del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”, C. Montes Urales 800, Lomas - Virreyes, Lomas de Chapultepec IV Secc, Miguel Hidalgo, 11000 Ciudad de México, CDMX (19°25'22" N 99°12'21" O). Se recolectó 1 ml de muestra de calostro y aproximadamente 200 gr de copro de neonato y, posteriormente fueron congeladas a -20° C para su posterior uso.

La toma de muestras de calostro humano se recuperó de 1 a 2 días postparto. Para la recolección de la leche humana se requiere de un primer paso de lavado de manos con agua tibia y jabón, seguido de esto, se realiza un masaje en el pecho del que se obtendrá la muestra. Los dedos pulgar, índice y medio se colocan en el pecho a una distancia de tres a cuatro cm del pezón formando una “C”. La mano se empuja hacia atrás, con dirección a las costillas, los dedos se comprimen sin deslizar, este proceso fue repetido hasta obtener una muestra de leche de 1ml en un recipiente limpio y estéril.

Para la toma de muestras de copro de neonato, se tomó una alícuota de copro después de la defecación de los neonatos usando una espátula estéril y colocándola en un tubo de polipropileno de 1.5 mL estéril.

### **Criterios de inclusión y exclusión**

Las madres participantes cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: Ser de origen mexicano por al menos dos generaciones, mujeres en el último trimestre

de embarazo, entre 16 y 45 años de edad, parto vaginal espontáneo o cesárea no electiva, embarazo único, embarazo a término, descendencia sin malformaciones congénitas. Los criterios de exclusión fueron: consumo de probióticos o alcohol, tabaquismo, diabetes, sobrepeso y obesidad antes o durante el embarazo, uso de antibióticos durante el último trimestre del embarazo, consumo regular de medicamentos como antiinflamatorios, laxantes, antiácido previo a la toma de la muestra, tratamiento hormonal, enfermedad gastrointestinal u otras patologías.

### **Extracción del RNA de bajo peso molecular de muestras de calostro humano y de copro de neonato**

#### **Preparación de la muestra**

Las muestras de calostro humano fueron descongeladas en hielo y, posteriormente fraccionadas por centrifugación a 13800 rpm por 5 min, para obtener tres fracciones de cada muestra, células, lípidos y leche desnatada, seguidamente, la parte de Células se transfirió en un tubo de 2 mL libres de RNA (Alsaweed et al., 2015; Kaeffer, 2023).

Las muestras de copro de neonato fueron descongeladas en hielo y posteriormente se tomaron alícuotas de 200 g de la muestra para continuar con el proceso de extracción de RNA.

#### **Extracción de RNA de bajo peso molecular usando el kit mirVana**

Para la extracción de RNA total, se usó el mirVana miRNA isolation Kit (Invitrogen™, Cat. AM1560) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- **Lysis:** El primer paso fue irrumpir las muestras en buffer de lisis desnaturizante, agregando 300 µL de Lysis/Binding Solution para muestras de Leche y 600 µl para Meconio, y posteriormente vortexear.
- **Extracción Orgánica:** Se añadieron 1/10 volumen de miRNA Homogenate Additive a la muestra y se mezcló agitando el tubo. Se agregó un volumen de Acid-Phenol:Chloroform equivalente al volumen del Lysis/Binding Solution, seguidamente se vortexeó 30-60 seg, y centrifugó por 5 min a 10,000 xg. La fase acuosa se removió y transfirió a un tubo limpio al cual se agregó un

volumen de 1.25 de etanol absoluto basado en lo obtenido de la fase acuosa y se mezcló cuidadosamente.

- **Filtrado y lavado:** Cada muestra fue colocada en un Filter Cartridge, al que se le añadió 700 µL de lo obtenido en el paso anterior y se centrifugó 15 s a 10,000 rpm, seguidamente el sobrenadante fue descartado; este paso se repitió hasta filtrar todo el volumen de la muestra. Posteriormente 700 µL de miRNA Wash solution 1 se agregó en el filtro y se centrifugó por 5-10 seg. descartando el sobrenadante, como siguiente paso se colocó 500 µl de Wash solution 2/3 en el filtro y se centrifugó 5-10 seg., descartando el sobrenadante, se repitió una vez más el paso con Wash solution 2/3.
- **Elución y Almacenamiento:** Se colocó el filtro en un tubo nuevo donde finalmente el RNA fue eluido con una solución de Elución libre de nucleasas que fue pre-calentado al 95° C. Las muestras se almacenaron a -70° C.

### **Cuantificación de RNA de bajo peso molecular**

La concentración se evaluó usando Qubit RNA HS Kit, como se describe a continuación.

Se preparó la Working Solution por dilución del Qubit RNA HS reagent 1:200 del Qubit RNA HS buffer. Se añadió la cantidad de Qubit Working Solution para determinado tubo para que el volumen final sea 200 µL. 10 µL de cada Qubit estándar (S1-S2) fue colocado al tubo indicado. Se añadió 1-20 µL de cada muestra en los tubos indicados. (cada muestra en tubos diferentes) y vortexear por 3-2 segundos. Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente por 2 min, y se procedió a leer los estándares y las muestras en el equipo.

Lectura de los estándares y las muestras

En la pantalla Home, se seleccionó “RNA high sensitivity” como el tipo de muestra, de la misma forma se seleccionó “Read standards” para proceder. El tubo que contiene el “Estándar#1” fue insertado en la cámara de muestra y se seleccionó “Read Estándar”. Se realizó el mismo procedimiento con el tubo “Estándar#2”.

Posteriormente se continuó a la lectura de las muestras por lo que se seleccionó la opción “Run samples” y se configuró el volumen de las muestras (1-20 µL) y la

unidad de medida ( $\mu\text{L}$ ). Las muestras fueron insertadas dentro de la cámara de tubo y se dio click en “Read Tube”. El valor Top (in large Font) es la concentración de la muestra original y el “Botton value” es la concentración de dilución.

## **Detección de miRNAs en las muestras por qPCR**

### **Realización de cDNA de las muestras**

Se preparó el mix de reacción que incluye lo siguiente por reacción: 4.16  $\mu\text{L}$  de Agua libre de nucleasas, 1.5  $\mu\text{L}$  de 10x solución de transcripción inversa, 0.19  $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNAsas, 0.15  $\mu\text{L}$  de 100 Mm dNTPs y 1  $\mu\text{L}$  de Transcriptasa inversa MultiScribe TM, haciendo un volumen final de 7  $\mu\text{L}$ .

A los 7  $\mu\text{L}$  del mix de reacción se agregó 3  $\mu\text{L}$  del precalentado RT primer específico de cada miRNA (RT-miR-146: 5'-GTC-GTA-TCC-AGT-GCA-GGG-TCC-GAG-GTA-TTC-GCA-CTG-GAT-ACG-ACC-AGC-CT-3' y RT-miR-21: 5'-GTC-GTA-TCC-AGT-GCA-GGG-TCC-GAG-GTA-TTC-GCA-CTG-GAT-ACG-ACT-CAA-CA-3') y 5  $\mu\text{L}$  de RNA total, haciendo un volumen final de 15  $\mu\text{L}$  por reacción. A cada reacción se le dio un spin de 5s, posteriormente se llevó a cabo la reacción de cDNA con las siguientes condiciones: 16° C por 30 min, 42° C por 30 min, 85 °C por 5 min y 4° C por 10 min. Para el control negativo se utilizó 10  $\mu\text{L}$  del mix de reacción y 5  $\mu\text{L}$  de Agua.

### **qPCR (Real Time PCR)**

Se preparó el Mix de reacción utilizando los reactivos Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific™, Cat. K0222, Waltham, MA, EE. UU.), el mix incluye lo siguiente por reacción: 10  $\mu\text{L}$  de agua, 1  $\mu\text{L}$  de primer Reverse URP- 5'-TATCCAGTGCAGGGTCCGA-3' (Universal Reverse Primer) y 12  $\mu\text{L}$  de Syber Green. Se colocó 23  $\mu\text{L}$  del mix en cada pocillo de la placa para PCR, seguidamente se agregó 1  $\mu\text{L}$  de Forward, específico para cada miRNA (FmiR 21- 5'-GCCCCGCTAGCTTATCAGACTGATG-3' y 146- 5'-CTCCGAGTGAGA-ACTGAATTCC-3') y, finalmente 1  $\mu\text{L}$  de la muestra de cDNA. Se utilizó como control positivo extracción de RNA de una muestra de Leche fresca y RNA total de tejido de hígado.

La placa se colocó en placas de PCR (Applied Biosystems™, Cat. 4375816, Waltham, MA, EE. UU.), la qPCR se ejecutó en el termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Cat. 4376357, Waltham, MA, EE. UU.) con las siguientes condiciones para 40 ciclos: Holding stage: 95 °C por 10 min, Cycling Stage: 95 °C 15 s, 60° C 1 min, Melt Curve Stage: 95° C 15 s, 60° C 1 min, 95° C 15 s. Los productos obtenidos se observaron en un gel de agarosa al 2%, y corridos a 80v durante 50 min.

### **Cuantificación del RNA Integrity Number (RIN)**

La cuantificación del Número de Integridad del RNA se realizó utilizando el RNA 6000 Pico Kit for 2100 Bioanalyzer Systems.

Preparación del RNA Ladder: Centrifugar el ladder y pipetear en un vial libre de RNAsas. Calentar para desnaturalizar el ladder durante 2 min a 70° C e inmediatamente colocar el vial en hielo. Añadir 90 µL de agua libre de RNAsas y mezclar minuciosamente. Preparar alícuotas de 0.5 mL en viales libre de RNAsas y guardar a -70° C y posterior a su uso descongelar en hielo



Preparación del Gel: Pipetear 550 µL de RNA gel matrix (rojo) en un filtro de centrifugación y centrifugar por 10 min a 1500 g  $\pm$  20 % a temperatura ambiente. Tomar una alícuota de 65 µL de gel filtrado en tubos de microcentrífuga libres de RNase incluidos en el kit y guardar las alícuotas a 2-8° C.


Preparación del Gel-Dye Mix: Equilibrar la temperatura de los reactivos a temperatura ambiente por 30 min antes de su uso protegiendo el dye concentrate de la luz.

Vortexear el RNA 6000 pico Dye concentrate (blue) por 10 segundos para llevar hacia abajo. Luego añadir 1 µL de RNA 6000 pico Dye concentrate a una lícua de 65 µL del gel filtrado, vortexear y centrifugar el tubo por 10 min a temperatura ambiente a 1300 g. Guardar el dye concentrate a 2-8° C protegido de la luz.

Cargado del Gel-Dye Mix: Equilibrar la temperatura de la mezcla del gel/dye a temperatura ambiente por 30 min antes de su uso siendo protegida de la luz. Asegurarse que la placa base de la estación de preparación del chip debe estar en

la posición (C), el clip en la posición más alta y el émbolo de la jeringa colocado a 1 mL.

Tomar un chip RNA Pico Kit y colocarlo en la estación de preparación. Pipetear 9.0 µL de la mezcla del gel y tinte al fondo del pozo marcado como  seguidamente, cerrar el clip de la estación de preparación, deslizar el émbolo de la jeringa hacia abajo hasta que sea sostenido por el clip, esperar por exactamente 30 s y entonces liberar el émbolo del clip, cuando el émbolo se retraiga al menos a la marca de 0.3 mL y abrir la estación de preparación del chip. Colocar 9 µL del mix de gel y tinte en cada uno de los pozos marcados como 

Cargado del RNA 600 Pico Conditioning Solution and Marker: Una vez realizado el paso anterior, pipetear 9 µL del RNA 600 Pico conditioning solution (blanco) en el pozo marcado como CS. A continuación, pipetear 5 µL del RNA 600 Pico marcador (verde) en el pozo marcado con un símbolo de escalera  y en cada uno de los 11 pozos para muestras, además de las muestras de Leche y Copro de neonato se utilizaron los controles positivos LM+, HG2+ y RKO.

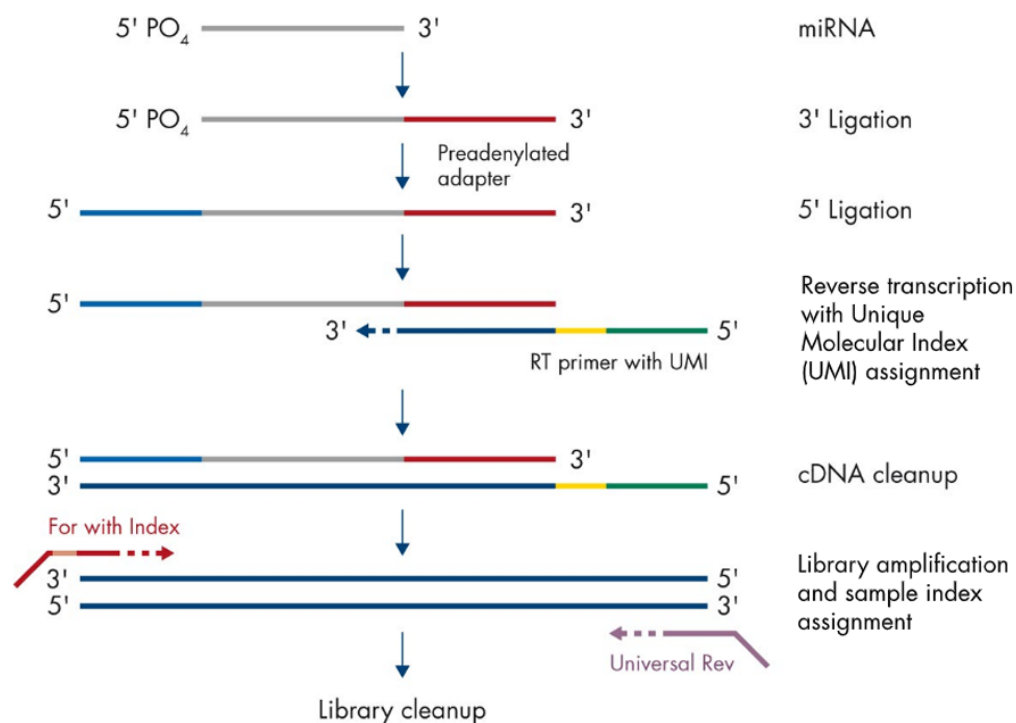
Cargado de la Escalera y Muestras: Calentar las muestras a 70° C por 2 min antes de cargarlas en el chip; descongelar la alícuota de la escalera y mantenerlas en hielo. Pipetear 1 µL de la escalera RNA 600 Pico diluido en los pozos marcados con el símbolo de escalera. Agregar 1 µL de cada muestra en cada uno de los 11 pozos para muestras. Una vez finalizado el cargado del chip, este será colocado de manera horizontal en el adaptador del IKA vortex (incluidos en el sistema), donde será vortexeado por 60 s a 2400 rpm, finalizado este paso, insertar el chip el Bioanalyzer 2100.

### **Secuenciación de miRNAs extraídos de las muestras de Leche y copro de Neonato.**

El proceso de secuenciación de las muestras de RNA total de Leche materna y Copro de neonato, se realizó en la unidad de secuenciación del IMSS, Centro Médico Nacional Siglo XXI, ubicado en Av. Cuauhtémoc 330, Doctores, Cuauhtémoc, 06720 Ciudad de México, CDMX. Utilizando el equipo de

secuenciación NextSeq® 500 y el QIAseq® miRNA Library Kit, que se basa en el siguiente fundamento:

*Los miRNAs maduros poseen un grupo hidroxilo en el extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5', permite a los adaptadores ser ligados específicamente a los extremos 3' y 5' del miRNA favoreciendo a la transcripción inversa universal y la preparación de librerías de miRNAs maduros con el multiplexado con índices duales únicos (UDI) por muestra basados en PCR. QIAseq UDIs usa una combinación fija de 2 motifs de barcodes de índice único por muestra, resultando en que cada uno recibe un par de UDI distinto. Esto permite eliminar el riesgo de lecturas de asignación errónea debido al salto de índice. Permitiendo el filtrado de lecturas mal asignadas durante la demultiplexación de cada muestra, generando una buena obtención de datos de salida de alta precisión.*



*Ligación 3': un adaptador de ADN preadenilado se liga a los extremos 3' de todos los miRNA maduros. La ligasa 3' QIAseq miRNA NGS está optimizada para una ligación eficiente, así como para la prevención de productos secundarios no deseados.*



*Ligación 5': un adaptador de ARN se liga al extremo 5' de los miRNA maduros.*

*Síntesis de ADNc: el cebador de transcripción inversa (RT) contiene un UMI integrado. El cebador RT se une a una región del adaptador 3' y facilita la conversión de los miRNA ligados 3'/5' en ADNc mientras asigna un UMI a cada molécula de miRNA. Durante la transcripción inversa, también se agrega una secuencia universal que es reconocida por los cebadores de indexación de la muestra durante la amplificación de la biblioteca.*

*Amplificación de la biblioteca: la amplificación de la biblioteca se logra utilizando una alícuota de un solo pocillo de la placa de los kits de índice UDI de miRNA QIAseq. En cada pocillo, se premezcla un índice i5 único con un índice i7 único; los oligos premezclados se utilizarán en una reacción de amplificación de la biblioteca para asignar a cada muestra un UDI. Las secuencias de índice específicas utilizadas en las placas de UDI de QIAseq miRNA se enumeran en las páginas específicas del producto QIAseq miRNA disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).*

*Limpieza de la biblioteca: después de la amplificación de la biblioteca, se realiza una limpieza de la biblioteca de miRNA utilizando un método basado en perlas magnéticas.*

## **Síntesis de Universal cDNA y preparación de librerías de miRNA**

### ***Ligación del 3´***

Descongelar y centrifugar el template RNA y colocarlo en hielo. Preparar los reactivos requeridos para reacción de ligación 3´. Descongelar el Adaptador QIAseq miRNA NGS 3´, el Buffer QIAseq miRNA NGS 3', el activador de ligación 2x miRNA, y agua libre de nucleasas a temperatura ambiente (15-25° C). Mezclar y centrifugar los tubos y mantener a temperatura ambiente.

En hielo, prepare la reacción de ligación del 3´, la cual consiste en 1 µL de cada uno de los siguientes reactivos: QIAseq miRNA NGS 3´, QIAseq miRNA NGS 3'RI, ligasa QIAseq miRNA NGS 3´ y QIAseq miRNA NGS 3´ Buffer; 10 µL del activador

de ligación 2x miRNA y, cantidad variable de Template RNA y agua libre de nucleasa, generando un volumen total de 20 µL, Centrifugar brevemente, mezclar por pipeteo y centrifugar. Añadir el RNA template a cada tubo que contiene el 3' ligation Master Mix. Centrifugar brevemente, mezclar por pipeteo y centrifugar brevemente. Incubar por 1h a 28° C, posteriormente incubar por 20 min a 65° C, pasado este tiempo, mantener a 4° C.

### ***Ligación del 5´***

Descongelar el adaptador QIAseq miRNA NGS 5' y QIAseq miRNA NGS 5' Buffer a temperatura ambiente. Mezclar dando pequeños golpes al tubo. Centrifugar los tubos brevemente para colectar cualquier liquido residual de los lados del tubo y mantener a temperatura ambiente.

En hielo, prepare la reacción de ligación de 5´ la cual consiste en 20 µL de la reacción de ligación, 15 µL de agua libre de nucleasas, 2 µL de Qiaseq miRNA NGS 5´ Buffer, 1 µL de Qiaseq miRNA NGS RI, 1 µL de ligasa Qiaseq miRNA NGS 5´, 1 µL del adaptador Qiaseq miRNA NGS 5´, generando un volumen total de 40 µL. añadiendo los componentes en el orden de lista. Centrifugar brevemente, mezclar por pipeteo subiendo y bajando de 10-15 veces, y centrifugar brevemente nuevamente. Continuar incubando por 30 min a 28° C, pasando este tiempo incubar por 20 min a 65° C y posteriormente mantener a 4° C.

### ***Transcripción Reversa***

Añadir 2 µL del QIAseq miRNA NGS RT iniciador a cada tubo, Centrifugar brevemente, mezclar por pipeteo subiendo y bajando de 15-20 veces, y centrifugar brevemente nuevamente. Seguidamente, incubar los tubos a 75° C, 70° C, 65° C, 60° C, 55° C, 37° C, 25° C y 4° C, todos con una duración de 2 min de incubación.

En hielo, preparar la reacción de Transcripción Reversa la cual consiste en 42 µL de la reacción de ligación 5´ + iniciador de RT de NGS QIAseq miRNA, 2 µL Qiaseq miRNA NGS RT Primer, 2 µL de agua libre de nucleasas, 12 µL de Qiaseq miRNA NGS Buffer, 1µL Qiaseq miRNA NGS RI y 1µL de la enzima RT miRNA de Qiaseq, generando un volumen total de 60 µL, centrifugar brevemente, mezclar por pipeteo

subiendo y bajando 12 veces, y centrifugar brevemente de nuevo. Posteriormente, incubar por 1 h a 50° C, incubar por 15 min a 70° C y mantener a 4° C.

### ***Preparación de perlas QIAseq miRNA NGS (perlas QMN)***

Vortexear las perlas QIAseq y el buffer de unión de perlas NGS QIAseq miRNA, para asegurar que las perlas están en suspensión y homogéneamente distribuidas.

Añadir 400 µL de perlas QIAseq a un tubo de 2 mL para y centrifugar brevemente e inmediatamente separar las perlas en un soporte magnético. Cuando las perlas hayan migrado completamente, remover cuidadosamente y descartar el sobrenadante; remover el tubo del soporte magnético

Pipetear 150 µL del buffer de unión de perlas NGS QIAseq miRNA sobre las perlas. Vortexear para resuspender el pellet de perlas y centrifugar brevemente. Repetir el paso del soporte magnético para separar las perlas como fue realizado en el paso anterior.

Añadir 400 µL del buffer de unión de perlas NGS QIAseq miRNA sobre las perlas. Vortexear minuciosamente para resuspender completamente el pellet de perlas.

### ***Limpieza de ADNc***

Las perlas QMN deben ser mezcladas todo el tiempo de su uso y ser trabajadas rápidamente y resuspender las perlas inmediatamente antes de uso.

Centrifugar los tubos que contengan la reacción de cDNA y, posteriormente añadir 143 µL de perlas QMN. Vortexear por 3 s y centrifugar brevemente e incubar por 5 min a temperatura ambiente.

Colocar los tubos en un soporte magnético por ~4 min o hasta que las perlas hayan migrado completamente, descartar el sobrenadante y mantener las perlas. Con las perlas aún en el soporte magnético; añadir 200 µL de etanol al 80%, remover inmediatamente y descartar el lavado de etanol. Repetir el lavado añadiendo 200 µL de etanol, inmediatamente remover y descartar el segundo lavado de etanol, posteriormente administrar aire seco a temperatura ambiente por 10 min. Eludir el

DNA añadiendo 17 µL de agua libre de nucleasas a los tubos, cerrar y remover los tubos del soporte magnético.

Pipetear cuidadosamente hasta que las perlas sean resuspendidas, centrifugar e incubar a temperatura ambiente por 2 min; devolver los tubos al soporte magnético por ~2 min o hasta que las perlas hayan migrado completamente, seguidamente, transferir 15 µL de DNA eludido a un nuevo tubo. El producto de limpieza de DNA puede ser guardado a -30 a -15° C en una temperatura constante de congelación.

### ***Amplificación de bibliotecas mediante índices***

Llevar a cabo la amplificación de las librerías usando los índices indicados en el kit, QIAseq miRNA NGS 12 Index IL (331592) o QIAseq miRNA NGS 48 Index IL (331595)

### ***Control de calidad presecuenciación de las bibliotecas de miRNA***

Analizar 1 µL de la librería de miRNA para secuenciación en Agilent Bioanalyzer usando un Chip de DNA de alta sensibilidad de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tamaño de una librería de miRNA es aproximadamente de 180 pb. Si un largo pico (más grande que 25% de la altura del miRNA peak) es observado a aproximadamente 157 pb (adapter-dimer), o si otras bandas no deseadas son notadas, se recomienda la escisión en el remanente de la librería de secuenciamiento de miRNA para seleccionar la librería de interés específica.

### ***Determinación de la concentración de la biblioteca y la asignación de lectura por muestra***

Determinar la concentración de 2 µL la librería de miRNA para secuenciación en el fluorometro Qubit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De la misma forma, determinar la molaridad de cada muestra (en nM) usando la siguiente ecuación.

$$(X \text{ ng}/\mu\text{L})(106)/(112450) = Y \text{ nM}$$

### ***Preparación para secuenciación***

Preparar la dilución individual o múltiple librerías a 4 nM usando el modelo de normalización estándar del protocolo de Illumina. posteriormente continuar con el

cargado de las librerías, seleccionando la opción FASTQ Only y eligiendo TruSeq Small RNA. Seguidamente continuar con el protocolo indicado de muestras para NextSeq de la guía de kit de Illumina.

### **Análisis *In silico* de secuencias de miRNAs**

Se utilizaron 20 secuencias de miRNAs usando small RNA sequencing, secuenciación de próxima generación, usando la plataforma Illumina HiSeq 2000, tomadas de los datos públicos del artículo “Human Milk Cells Contain Numerous miRNAs that May Change with Milk Removal and Regulate Multiple Physiological Processes” (doi: 10.3390/ijms17060956) (Alsaweed et al., 2016) utilizando los motores de búsqueda “miRNAs in Human Milk” en el portal PubMed del Repositorio National Center of Biotechnology Information (NCBI). Donde se obtuvo el archivo de acceso list y los metadatos del estudio.

El artículo se basa en el estudio de las diferencias en la composición de miRNAs de la leche materna humana de madres sanas con un periodo de amamantamiento de 2 meses. La toma de muestras fue realizada durante la mañana utilizando un extractor de leche eléctrico, se tomaron 5 mL de muestra de Leche antes (Before) y 5 mL después (After) de alimentar al bebé durante al menos 5 min, las muestras obtenidas fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para el fraccionamiento de la leche y extracción de miRNAs. Este estudio se realizó en una población de madres provenientes de Australia

### **Evaluación de la calidad de las lecturas**

Para llevar a cabo la preparación de las secuencias, se utilizó el Cluster Híbrido de Supercómputo- Xiuhcoatl, ubicado en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) unidad Zacatenco, ubicado en Av Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, 07360 Ciudad de México, CDMX.

El proceso de preparación de las muestras consistió en la obtención del accession list de las secuencias de miRNAs y se utilizó el siguiente pipeline bioinformático desarrollado por el grupo de investigación.

```
#!/bin/sh
#PBS -N mirnas_lab0
#PBS -o mirnas.out
#PBS -e mirnas.err
#PBS -m abe
#PBS -M noemi.lazaro@cinvestav.mx
#PBS -V

source ~/miniforge3/bin/activate
conda activate mirna

mkdir -p miRNAs/trimmed miRNAs/sam miRNAs/bam miRNAs/counts miRNAs/fastqc

# FastQC
fastqc --outdir miRNAs/fastqc --kmers 7 -f 'fastq' miRNAs/seqs/*.fastq

# Cutadapt with parallel processing
parallel -j 8 'cutadapt -a AGATCGGAAGAG -q 30 -m 18 -o miRNAs/trimmed/{./}.fq.gz {}' ::: miRNAs/seqs/*.fastq

# Bowtie2 with parallel processing
parallel -j 8 'bowtie2 -x index/hg38 -U {} -S miRNAs/sam/{./}.sam' ::: miRNAs/trimmed/*.fq.gz

# SAM to BAM with parallel processing
parallel -j 8 'samtools sort {} -O bam -o miRNAs/bam/{./}.bam' ::: miRNAs/sam/*.sam

# FeatureCounts
featureCounts -a "mirBASE/hsa.gff3" -t "miRNA" -g "Name" -o miRNAs/counts/counts.out miRNAs/bam/*.bam
```

Se obtienen los archivos en formato FastQ, los cuales nos permiten revisar la calidad de los datos, como información básica, calidad de la secuencia por base, secuencias sobrerrepresentadas, contenido de adaptador, etc. Se pudo identificar la presencia de las secuencias sobrerrepresentadas, que pertenece al Adaptador Illumina Small RNA 3'Adapter- 5' TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-3'.

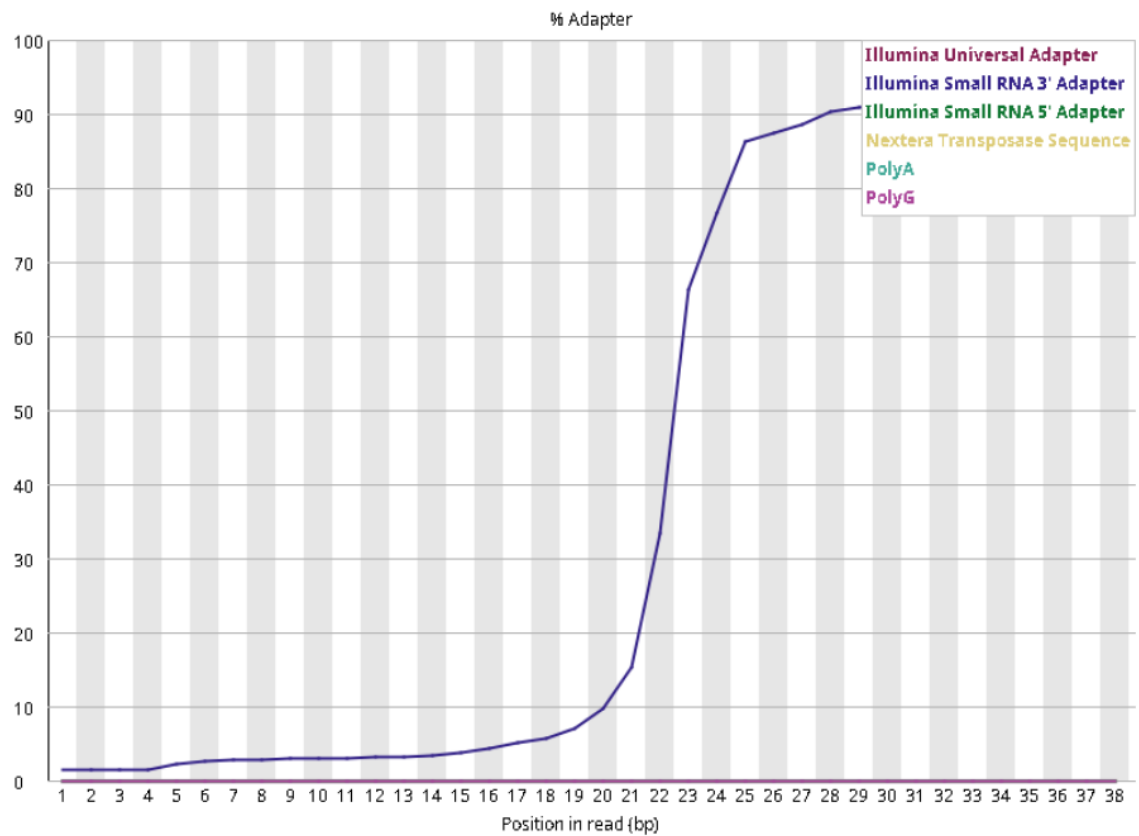
## ✓ Basic Statistics

Measure	Value
Filename	SRR2107190.fastq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	15609911
Total Bases	764.8 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	49
%GC	51

## ✗ Overrepresented sequences

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
TGAGGTAGTAGATTGTATAGTTTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATCC	1042853	6.68071073563456	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 27bp)
AACATTCAACGCTGTCGGTGAGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATCC	713095	4.568219511309193	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 27bp)
TAACACTGTCTGGTAAAGATGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATCCA	555931	3.5613976274432315	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 28bp)
TGAGGTAGTAGATTGTATAGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATCCA	528083	3.3829981477793183	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 28bp)
GTGGGGGGCCCAAGTCTTCTGATCGAGGCTGGAATTCTCGGGTGCCA	450741	2.8875308770178125	No Hit
TGAGGTAGTAGTTGTATAGTTTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATCC	424681	2.7205856586882526	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 27bp)
TGGGGGGCCCAAGTCTTCTGATCGAGGCTGGAATTCTCGGGTGCCAA	420451	2.693487490095235	No Hit
AACATTCAACGCTGTCGGTGAGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATC	347926	2.2288788193603413	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 26bp)
AAGCTGCCAGTTGAAGAACTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATCC	342638	2.195002905525855	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 27bp)
TGTAAACATCCCCGACTGGAAGCTTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATC	336023	2.1526259823006035	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 25bp)
AAGCTGCCAGTTGAAGAACTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATCCA	313182	2.0063022780847373	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 28bp)
TTTGTTCTGTTCCGCTCGGTGATGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATCC	302199	1.9359431325393206	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 27bp)
TCAGTGCACTACAGAACCTTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATCC	294367	1.8857698804304521	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 27bp)
TGTAAACATCCTCGACTGGAAGCTTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATC	284288	1.8212019274164986	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 25bp)
TGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATCCAGTCACATTCTATCTCGTATG	224599	1.438823065679234	RNA PCR Primer, Index 27 (100% over 49bp)
TGAGGTAGTAGTTGTATAGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATCCA	214757	1.3757733788488609	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 28bp)
TTTGGAATGGTAGAACTCACACTTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATC	179016	1.1468098697039335	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 25bp)
TCAGTGCACTACAGAACCTTGTCTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATC	171667	1.0997308056400834	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 26bp)
TTTGGAATGGTAGAACTCACATGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAATCC	164941	1.0566427957212567	RNA PCR Primer, Index 1 (100% over 27bp)

## ✖ Adapter Content



### Recorte y Filtrado

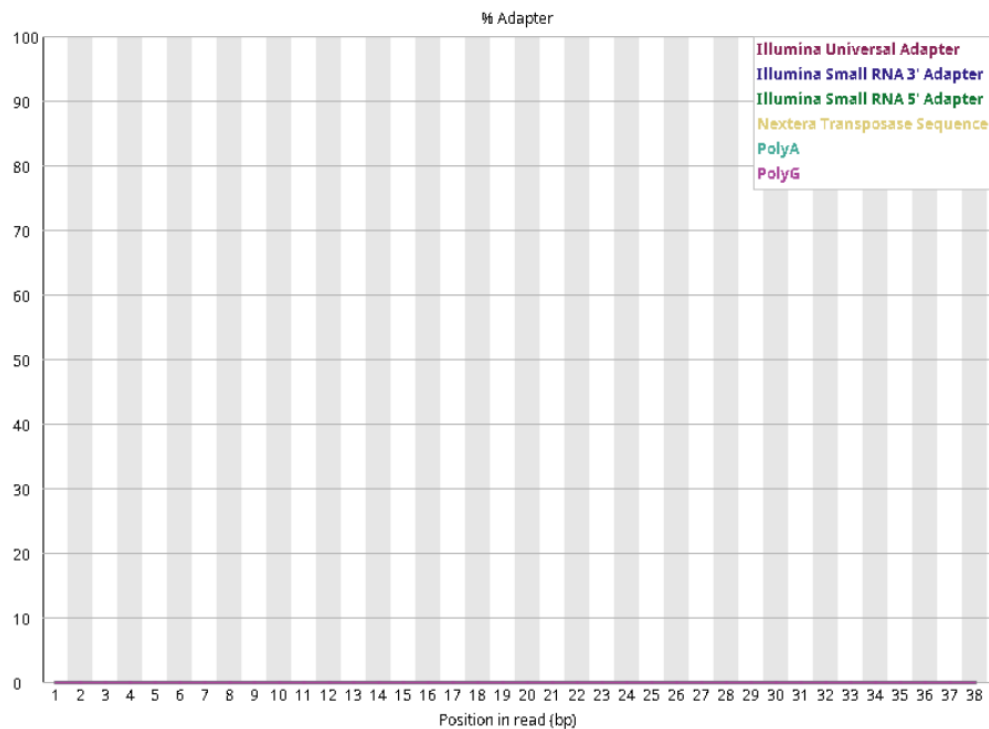
Para eliminar lecturas de baja calidad y la secuencia de los Adaptadores utilizados se utilizó el comando cutadapt y se vuelven a analizar el análisis de los archivos FastQC para cerciorarse de que no existan secuencias sobrerrepresentadas ni contenido de adaptadores.



## ✖ Overrepresented sequences

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
TGTAAACATCCCCGACTGGAAG	1564278	5.330311906175377	No Hit
TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	1431556	4.878058753723314	No Hit
TCAGTGCACTACAGAACTTTGT	1348336	4.594484761867701	No Hit
TGTAAACATCCCCGACTGGAAGCT	1286800	4.384799479930343	No Hit
TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	1248720	4.255041037129792	No Hit
TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	1124978	3.833387433426388	No Hit
TGAGGTAGTAGATTGTATAGT	734406	2.5025046991433966	No Hit
TAATACTGCCGGTAATGATGGA	707751	2.4116771967051442	No Hit
TGTAAACATCCCCGACTGGAA	609044	2.0753309095855577	No Hit
TGAGGTAGTAGGTTGTGTGTT	492005	1.676517926735412	No Hit
TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	437166	1.489652820518517	No Hit
TGAGGTAGTAGTTTGTACAGT	433135	1.4759170988029444	No Hit
TCAGTGCACTACAGAACTTTG	413897	1.4103631880204608	No Hit
TAACACTGTCTGGTAACGATG	382747	1.3042188735972169	No Hit
TGAGAACTGAATTCATAGGCT	377258	1.2855149846126523	No Hit
TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT	308428	1.0509752362418057	No Hit
TGAGGTAGTAGTTGTATAG	299761	1.0214422419205778	No Hit
TTTGTTTCGTCGGCTCGCGTGA	298737	1.0179529392570335	No Hit
TGTAAACATCCCCGACTGGAAGC	268628	0.9153558553735841	No Hit

## ✔ Adapter Content



### **Ensamblado de las secuencias**

Para el alineamiento de las secuencias se utilizó el genoma de referencia hg38 obtenido de UCSC de la Universidad de California Santa Cruz Dic. 2013 (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Para este paso se utilizó el comando Bowtie2, donde obtenemos archivos con la extensión. sam. Los archivos .sam fueron convertidos a archivos .bam, para ello se utilizó el comando samtools sort.

### **Mapeo y conteo de lecturas**

Para este paso se utilizó un el Reference Anotation miRBASE hsa.gff3, esto se realizó con el comando FeatureCounts.

### **Análisis utilizando lenguaje R**

Todos los análisis bioinformáticos fueron realizados usando R 4.3.3 en R studio versión 2024.04.2.0. además del uso de los paquetes adicionales ComplexHeatmap versión 2.18.0, DESeq2 versión 1.42.1 (Love et al., 2014), ALDEx2 versión 1.34 (Fernandes et al., 2013) edgeR 4.0.16 (Robinson et al., 2010).

Un HeatMap es un método de visualización estadística utilizado en datos de tipo matriz para revelar patrones similares compartidos por subconjuntos de filas y columnas (Gu, 2022). Para la realización del HeatMap se utilizó el paquete ComplexHeatmap tomando el 100% de los miRNAs con el 50% de abundancia.

```

Metadatos<-read_csv("metadata/smetada.txt")
descri <- read_tsv("metadata/descri2.txt")
counts <- read_tsv("metadata/counts.out") %>%
  select(-(Chr:Length)) %>%
  column_to_rownames("Geneid")

colnames(counts) <- gsub("(Arch-fastqS/bams/)(SRR\\d+)(.bam)", "\\2",
colnames(counts))

Metadatos1 <- Metadatos %>%
  select(Run, BioSample) %>%
  merge(descri, by.x = "BioSample", by.y = "Biosample") %>%
  column_to_rownames("Run") %>%
  mutate(time = ifelse(grepl("_A", Description), "After", "Before"),
          individual = gsub("(\\d)(.*)", "\\1", Description),
          time = relevel(factor(time), "Before"))

counts <- as.matrix(counts)

counts <- counts[rowSums(counts) > 0,]

miR_top <- counts[rowSums(counts > 0) > ncol(counts) * 0.5, ]

heatmap(miR_top)

ComplexHeatmap::pheatmap(miR_top, scale = "row", show_rownames = F,
                          show_colnames = F,
                          annotation_col = data.frame(time =
Metadatos1$time))

c_abun <- apply(counts, 2, function(x) x / sum(x) * 100)

```

También se buscó generar un gráfico para conocer los miRNAs más representativos encontrados en los dos grupos de muestras de leche empleados en el artículo, para esto se utilizó la Media y Desviación Estándar sobre la abundancia de los miRNAs de las muestras de leche Before y After.

```

data.frame(
  mean_Before = apply(c_abun[,rownames(Metadatos1[Metadatos1$time == "Before",])], 1, mean),
  mean_After = apply(c_abun[,rownames(Metadatos1[Metadatos1$time == "After",])], 1, mean),
  sd_Before = apply(c_abun[,rownames(Metadatos1[Metadatos1$time == "Before",])], 1, sd),
  sd_After = apply(c_abun[,rownames(Metadatos1[Metadatos1$time == "After",])], 1, sd)
) %>%
  arrange(desc(mean_After)) %>%
  head(15) %>%
  rownames_to_column("miRNA") %>%
  pivot_longer(cols = -miRNA, names_to = c("stat", "time"), names_sep = "_",
    values_to = "values") %>%
  pivot_wider(id_cols = c(miRNA, time), names_from = stat,
    values_from = "values") %>%
  mutate(miRNA = fct_reorder(miRNA, desc(mean))) %>%
  ggplot(aes (x = miRNA, y = mean, fill = time)) +
  geom_col(position = "dodge") +
  geom_errorbar(aes(ymin = mean-sd, ymax = mean + sd), position = "dodge") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1, vjust = 1))

```

Para el estudio de análisis diferencial se utilizaron tres métodos diferentes encontrados en R, entre ellos DESeq2 version 1.42.1, el cual es un método que utiliza la estimación de contracción para las dispersiones y Fold Change para mejorar la estabilidad y la interpretabilidad de las estimaciones (Love et al., 2014). Con este método se generó un volcano plot, que es un tipo de diagrama de dispersión que muestra la significación estadística (Pvalue) frente a la magnitud del cambio (Fold Change), el cual permite la identificación visual de genes con grandes Folds Changes estadísticamente significativos. En un volcano plot, los genes estadísticamente más significativos se encuentran en la parte superior del gráfico; los genes regulados al alza están situados hacia la derecha, mientras que, los regulados a la baja están localizados hacia la izquierda (Doyle). Para generar el gráfico de Volcano plot se tomaron las variables log2FoldChange y pvalue. Para obtener los DESeq graficos de barra, se tomaron las variables pvalue < 0.05 y log2FoldChange > 1.5.

```

dds <- DESeqDataSetFromMatrix(countData = counts[,rownames(Metadatos1)],
                              colData = Metadatos1,
                              design = ~ time)

dds <- DESeq(dds)

resultsNames(dds)

res <- results(dds) %>%
  data.frame() %>%
  rownames_to_column("miRNA") %>%
  mutate(time = case_when(
    pvalue < 0.05 & log2FoldChange > 1.5 ~ levels(Metadatos1$time)[2],
    pvalue < 0.05 & log2FoldChange < -1.5 ~ levels(Metadatos1$time)[1]
  ))

DESeq_volcano <- res %>%
  ggplot(aes(x= log2FoldChange, y= -log10 (pvalue),
             color = time))+
  geom_point() +
  geom_hline(yintercept = -log10(0.05), linetype= "dashed") +
  geom_vline(xintercept = c(- 1.5, 1.5), linetype= "dashed")

DESeq_bar <- res %>%
  filter(pvalue < 0.05 & abs(log2FoldChange) > 1.5) %>%
  ggplot(aes(x=log2FoldChange, y= miRNA, fill=time)) +
  geom_col() +
  geom_vline(xintercept = 0)

```

Otro método de análisis diferencial utilizado fue ALDEx2, el cual toma como entrada los recuentos de secuenciación por gen para cada réplica y una lista que indica qué réplica debe agruparse en qué condición. Calcula una tabla para todos los genes que contiene lo siguiente: datos de expresión media individual para cada gen en cada muestra, la expresión media para cada gen en cada condición, el nivel de expresión media en todas las condiciones, la diferencia absoluta media de pliegues, el tamaño del efecto medio, la diferencia mediana dentro de la condición y el cuartil de cero (Fernandes et al., 2013). También se generó un volcano plot para determinar los puntos de corte de las variables, que en este caso se utilizaron los datos de la diferencia media en los valores entre log-ratio (clr) y los grupos (diff.btw)

y el valor p esperado de la prueba de rangos de Wilcoxon (wi.ep.). Mientras que, para ALDEx gráfico de barras se tomaron los datos diff.btw y los miRNAs.

```
x.aldex <- aldex(counts, as.character(Metadatos1$time))

aldex.plot(x.aldex, type="volcano", test="welch", xlab="Difference",
           ylab="-1(log10(q))", main='Volcano plot')

aldexresult<- x.aldex %>% #para filtrar
  #filter(we.ep <0.05 | wi.ep <0.05) %>%
  dplyr::select(diff.btw, we.ep, wi.ep) %>%
  mutate(diff.btw = -diff.btw,
         time = case_when(
           (we.ep <0.05 | wi.ep <0.05) & diff.btw > 1.5 ~ levels(Metadatos1$time)[2],
           (we.ep <0.05 | wi.ep <0.05) & diff.btw < -1.5 ~ levels(Metadatos1$time)[1]
         )) %>%
  rownames_to_column("miRNA")

aldex_volcano <- aldexresult %>%
  ggplot(aes(x= diff.btw, y= -log10 (wi.ep),
             color = time))+
  geom_point() +
  geom_hline(yintercept = -log10(0.05), linetype= "dashed") +
  geom_vline(xintercept = c(- 1.5, 1.5), linetype= "dashed")

aldex_bar <- aldexresult %>%
  filter(!is.na(time)) %>%
  ggplot(aes(x=diff.btw, y= miRNA, fill=time)) +
  geom_col() +
  geom_vline(xintercept = 0)
```

De la misma manera se utilizó, edgeR 4.0.16 (Robinson et al., 2010) que estima las dispersiones gen por gen mediante máxima verosimilitud condicionando el recuento total para ese gen. Se utiliza un procedimiento empírico de Bayes para reducir las dispersiones hacia un valor de consenso, finalmente se evalúa la expresión diferencial para cada gen utilizando una prueba para datos sobredispersos. De la misma manera, se generó un gráfico Volcano plot en el cual se tomaron como variables los datos de Logaritmo de Fold Change (logFC) y el valor de P (PValue), mientras que, para ALDEx gráfico de barras se tomaron los datos diff.btw y los miRNAs hallados en las muestras.

```

dge <- DGEList(counts = counts, group = Metadatos1$time)

keep <- filterByExpr(y= dge)
dge <- dge[keep,, keep.lib.sizes=FALSE]

dge <- calcNormFactors(object=dge)
dge <- estimateDisp(y =dge)
et <- exactTest(object = dge)
top_degs <- topTags(object=et, n="Inf")
summary(decideTests(object=et, lfc=1))

edger_res <- top_degs %>%
  data.frame() %>%
  mutate(time = case_when(
    PValue < 0.05 & logFC > 1 ~ levels(Metadatos1$time)[2],
    PValue < 0.05 & logFC < -1 ~ levels(Metadatos1$time)[1]
  )) %>%
  rownames_to_column("miRNA")

edger_volcano <- edger_res %>%
  ggplot(aes(x= logFC, y= -log10 (PValue),
             color = time))+
  geom_point() +
  geom_hline(yintercept = -log10(0.05), linetype= "dashed") +
  geom_vline(xintercept = c(- 1, 1), linetype= "dashed")

edger_bar <- edger_res %>%
  filter(!is.na(time)) %>%
  ggplot(aes(x=logFC, y= miRNA, fill=time)) +
  geom_col() +
  geom_vline(xintercept = 0)

```

## RESULTADOS

### Extracción e integridad y concentración

Después de la extracción de RNA total de las muestras y del análisis de concentración se eligieron los siguientes binomios (16 Calostro y 16 Meconio) que cumplieran con las mejores concentraciones de RNA y formaban binomios completos (Tabla 1).

Calostro	RNA Qubit ng/μl	Copro de bebé	RNA Qubit ng/μl
L1	0.616	M1-2	4
L4	4.6	M4-1	6.68
L5	2.95	M5	12
L11	5.74	M11	50.4
L13	12.8	M13-H1	39.4
L16	2.56	M16	12.6
L18	4.68	M18	7.1
L22	3.7	M22	4.4
L23	2	M23	1.2
L26	3.84	M26-1	7.02
L29	2.88	M29	3.6
L34	2.94	M34	6.24
L36	8.44	M36	3.4
L46	2.18	M46	7.84
L55	0.996	M55	1.52
L66	2.32	M66	1.84
L70	1.79	M70	3.7

**Tabla 1:** Binomios (Calostro materno y copro de neonatos) seleccionado para secuenciación.



## Detección de miRNAs en las muestras de binomios por qPCR

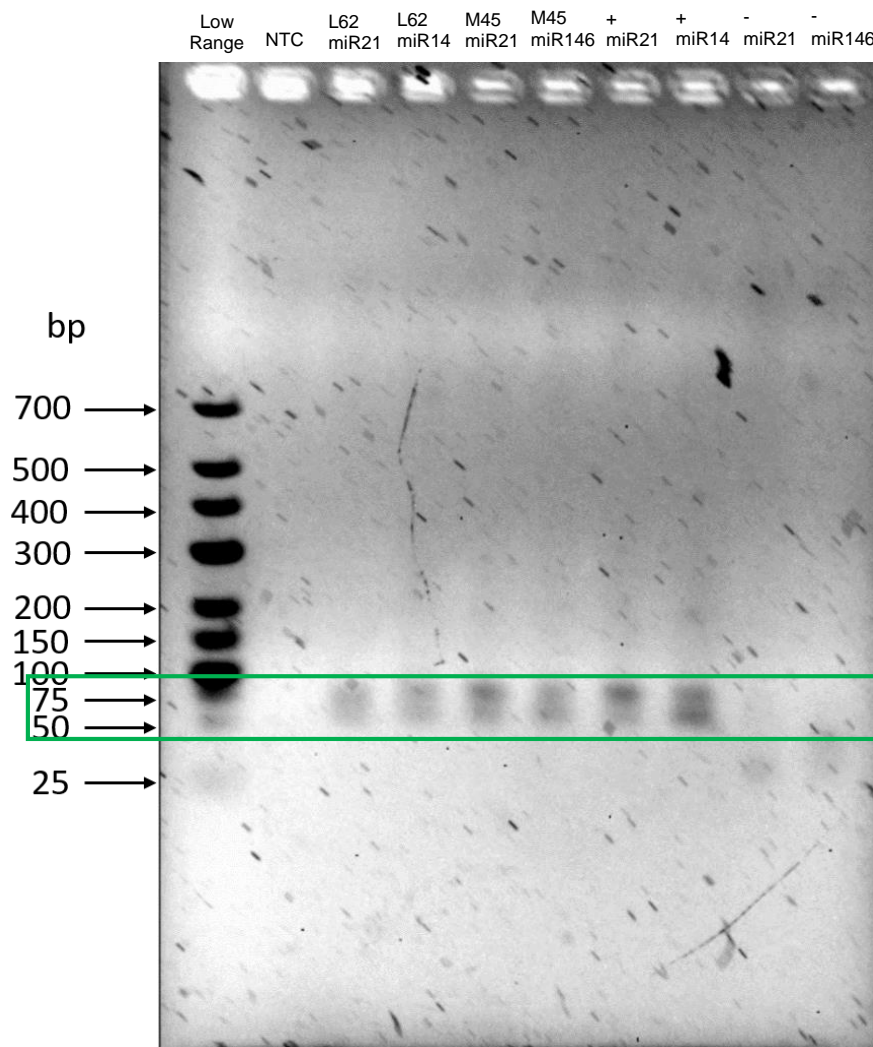
Se realizó análisis de qPCR para demostrar la presencia de miRNAs conocidos de la leche materna. Las muestras L62 y M45 se seleccionaron para llevar a cabo esta técnica, además de una muestra de leche materna fresca como control positivo (Tabla 2). Los datos indican la presencia de miR21 y miR146 en las muestras de calostro y copro de neonato, así como en el control positivo, pues los Ct (threshold cycle) indican la cantidad de la secuencia objetivo se encuentra en la muestra, por otro lado, los pocillos con los NTC (No Template Control) y los NEG (Control negativo) obtuvieron los resultados “undeterminate”.

	1	2	3	4	5
<b>A</b>	NTC miR21 Ct: undetermin	L62 miR21 Ct: 27.42	M45 miR21 Ct: 23.43	Control miR21 Ct: 23.4	NEG miR21 Ct: undetermin
<b>B</b>	NTC miR21 Ct: 39.43	L62 miR21 Ct: 27.67	M45 miR21 Ct: 23.63	Control miR21 Ct: 23.51	NEG miR21 Ct: undetermin
<b>C</b>	NTC miR21 Ct: 36.71	L62 miR21 Ct: 29.33	M45 miR21 Ct: 22.61	Control miR21 Ct: 23.17	NEG miR21 Ct: undetermin
<b>D</b>	NTC miR146 Ct: undetermin	L62 miR146 Ct: 26.55	M45 miR146 Ct: 31.72	Control miR146 Ct: 23.27	NEG miR146 Ct: undetermin
<b>E</b>	NTC miR146 Ct: undetermin	L62 miR146 Ct: 25.69	M45 miR146 Ct: 32.07	Control miR146 Ct: 23.8	NEG miR146 Ct: undetermin
<b>F</b>	NTC miR146 Ct: undetermin	L62 miR146 Ct: 26.1	M45 miR146 Ct: 31.76	Control miR146 Ct: 25.1	NEG miR146 Ct: undetermin

**Tabla 2:** Resultados de qPCR en la identificación de miRNAs en muestras de calostro y copro de Neonato.

### Fraccionamiento electroforético de muestras con RNA extraído

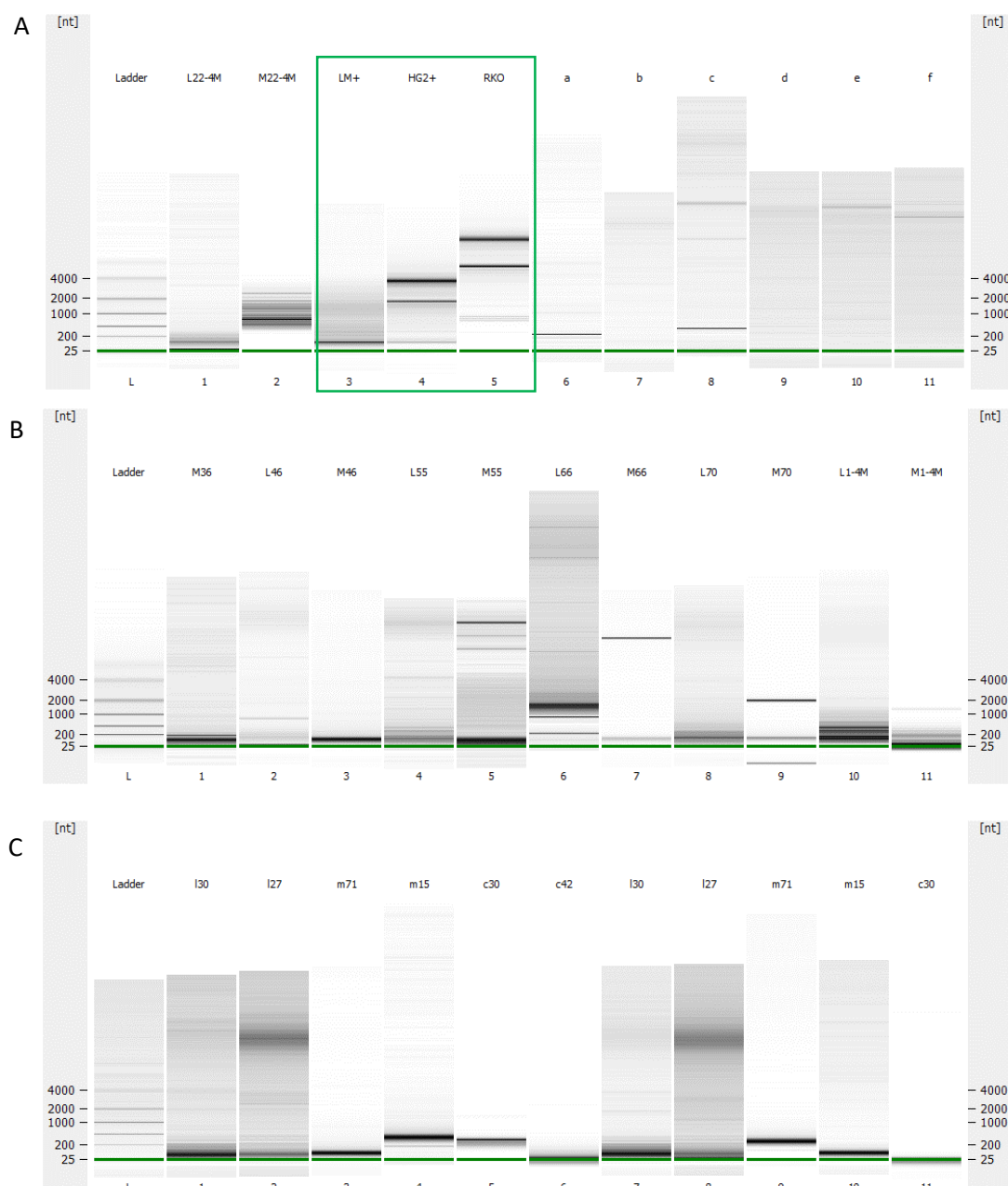
Se realizó un gel de agarosa al 2%, con la finalidad de correr los productos obtenidos de qPCR (Figura 1), en el primer pocillo se encuentra el marcador de peso molecular, en el segundo pocillo NTC, en los pocillos 3 y 4 se encuentra la muestra de calostro (L62), con los productos de qPCR para miR21 y miR146 respectivamente; en los pocillos 5 y 6 se encuentran las muestras de Copro de Neonato (M45) con los productos de qPCR para miR21 y miR146, respectivamente; en los pocillos 7 y 8 se colocaron los productos de qPCR del control positivo para los miRNAs 21 y 146, respectivamente, por último en los pocillos 9 y 10 se encuentran los controles negativos para los miRNAs 21 y 146. En los resultados del gel podemos observar las bandas de 60 pb.

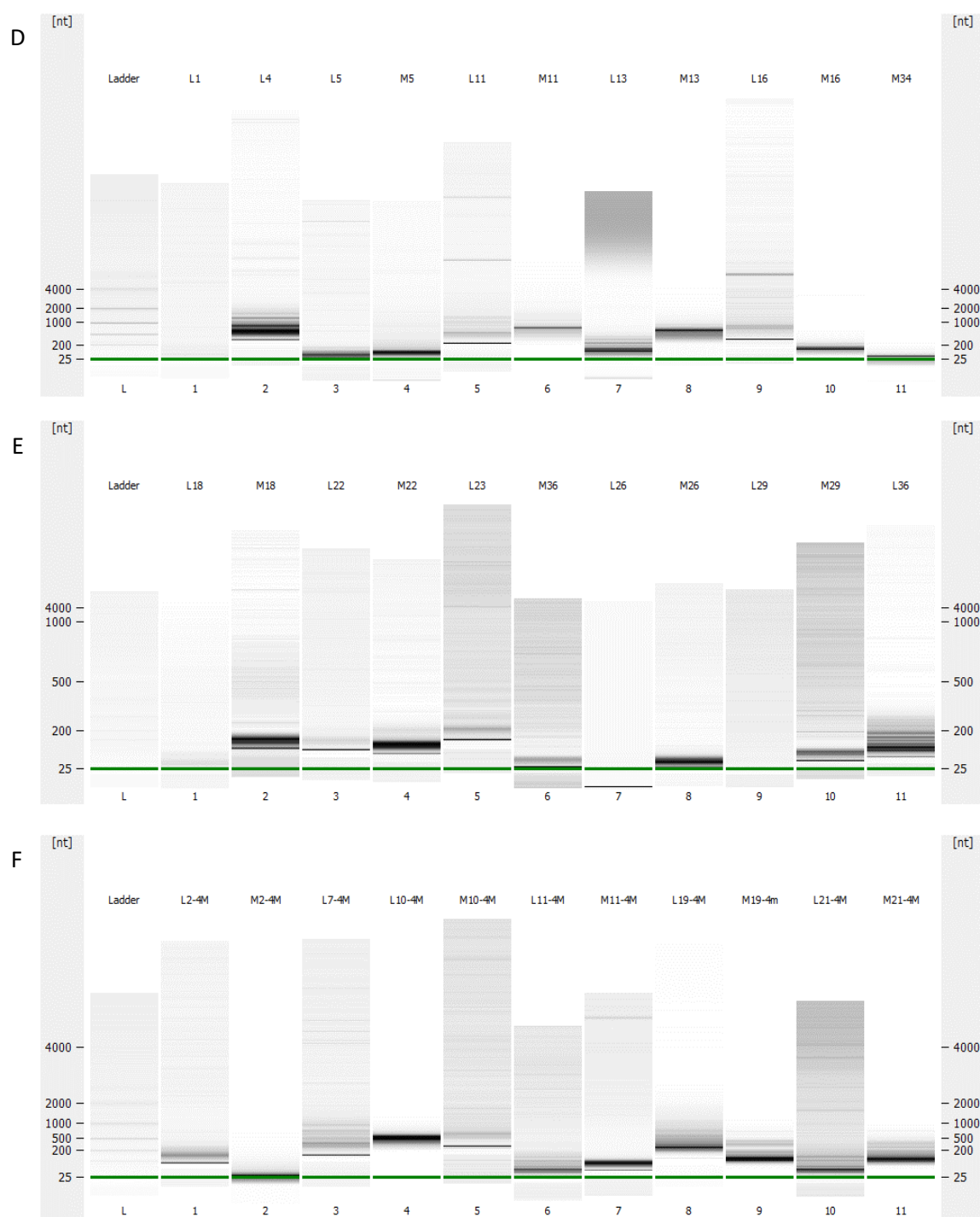


**Figura 1:** Gel de agarosa al 2%, en el que se observan los pesos moleculares de los productos de qPCR.

## Resultados de electroforesis capilar por BioAnalyzer

Los resultados por nucleótidos de las muestras de RNA total de bajo rendimiento de calostro y de copro de Neonato (Figura 2), se muestra el carril del marcador de peso (L) en todos los geles, en la Figura 1A, muestra las bandas de controles positivos LM+, HG2+ y RKO en los carriles 3, 4 y 5, respectivamente; (Figura 2- B, C, D, E y F) indican las bandas de las muestras utilizadas en este trabajo, en donde podemos observar bandas con un peso de aproximadamente 50 nt. parecidas a las obtenidas con el control positivo.



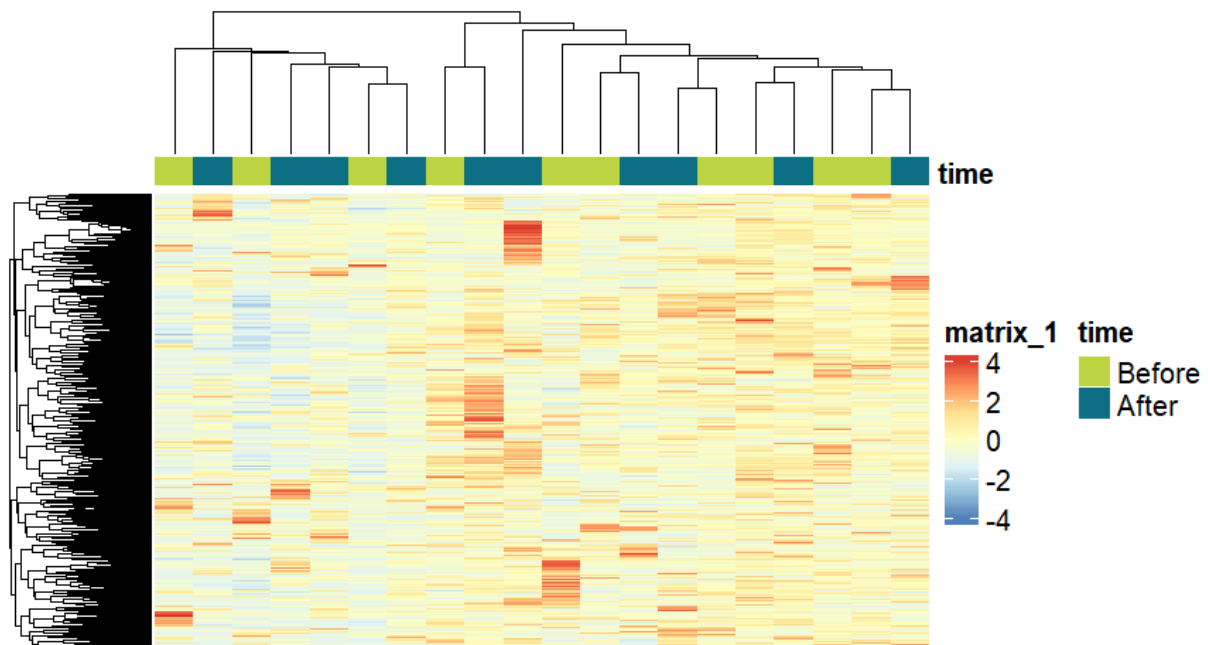


**Figura 2:** Resultados de electroforesis capilar de muestras de calostro y copro de Neonato realizada por BioAnalyzer. (A) Carriles 3, 4 y 5, controles positivos. Carriles 1 y 2, muestras de Leche y Copro de Neonato. (B, C, D, E y F) Muestra el peso de las bandas del resto de las muestras de estudio.

La siguiente sección de resultados fue llevada a cabo haciendo uso de las lecturas de miRNAs tomadas del artículo titulado “Human Milk Cells Contain Numerous miRNAs that May Change with Milk Removal and Regulate Multiple Physiological Processes” (doi:10.3390/ijms17060956) (Alsaweed et al., 2016)

### HeatMap realizado con secuencias de miRNAs obtenidos de bases de datos

Resultados de HeatMap generado a partir del 100% de los miRNAs con el 50% de abundancia hallados en las muestras (Figura 3), donde se observa que no se generan ninguna agrupación entre las muestras Before (Verde) y After (Azul) en el gráfico. Podemos ver en el gráfico la escala de rojo a azul, donde rojo indica alto nivel de expresión y azul menor expresión de los miRNAs con respecto a las muestras.

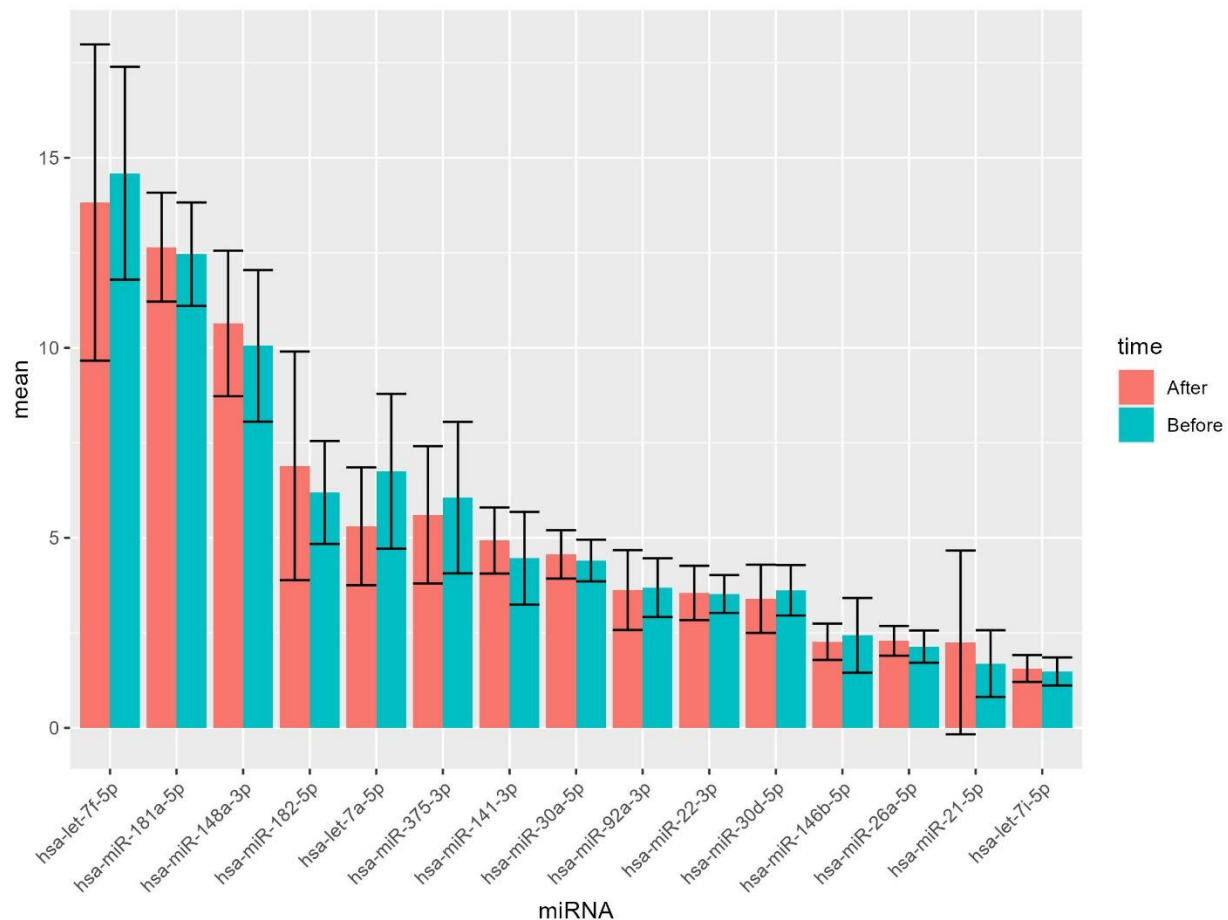


**Figura 3:** Heat-Map demostrando los patrones de relación y expresión de miRNAs en muestras de Leche Before y After alimentación.

### miRNAs más abundantes en las muestras

Gráfico de barras que indica los 15 miRNAs abundantes en las muestras de leche humana con el total de las lecturas obtenidas. Los miRNAs más abundantes en las

muestras antes (Before) del amamantamiento se muestran con el color azul y los miRNAs más abundantes en las muestras después (Before) del amamantamiento se muestran en naranja, los miRNAs están presentados de mayor a menor basado en la media, donde podemos observar que uno de los miRNAs más abundantes fueron let-7f-5p, miR-181a-5p, miR-148a-3p y unos de los menos abundantes fueron miR-26a-5p, miR-21-5p, let-7i-5p, los cuales se comparten en ambos grupos muestrales (Figura 4).



**Figura 4:** El gráfico de barras muestra el patrón de expresión de los 15 miRNAs más abundantes en las muestras de Leche Before (Azul) y After (Naranja). El eje Y indica la media de expresión de cada miRNA, eje X indica los miRNAs de las muestras de Leche.

## **Análisis diferencial de los miRNAs en muestras de Leche**

### **DESeq**

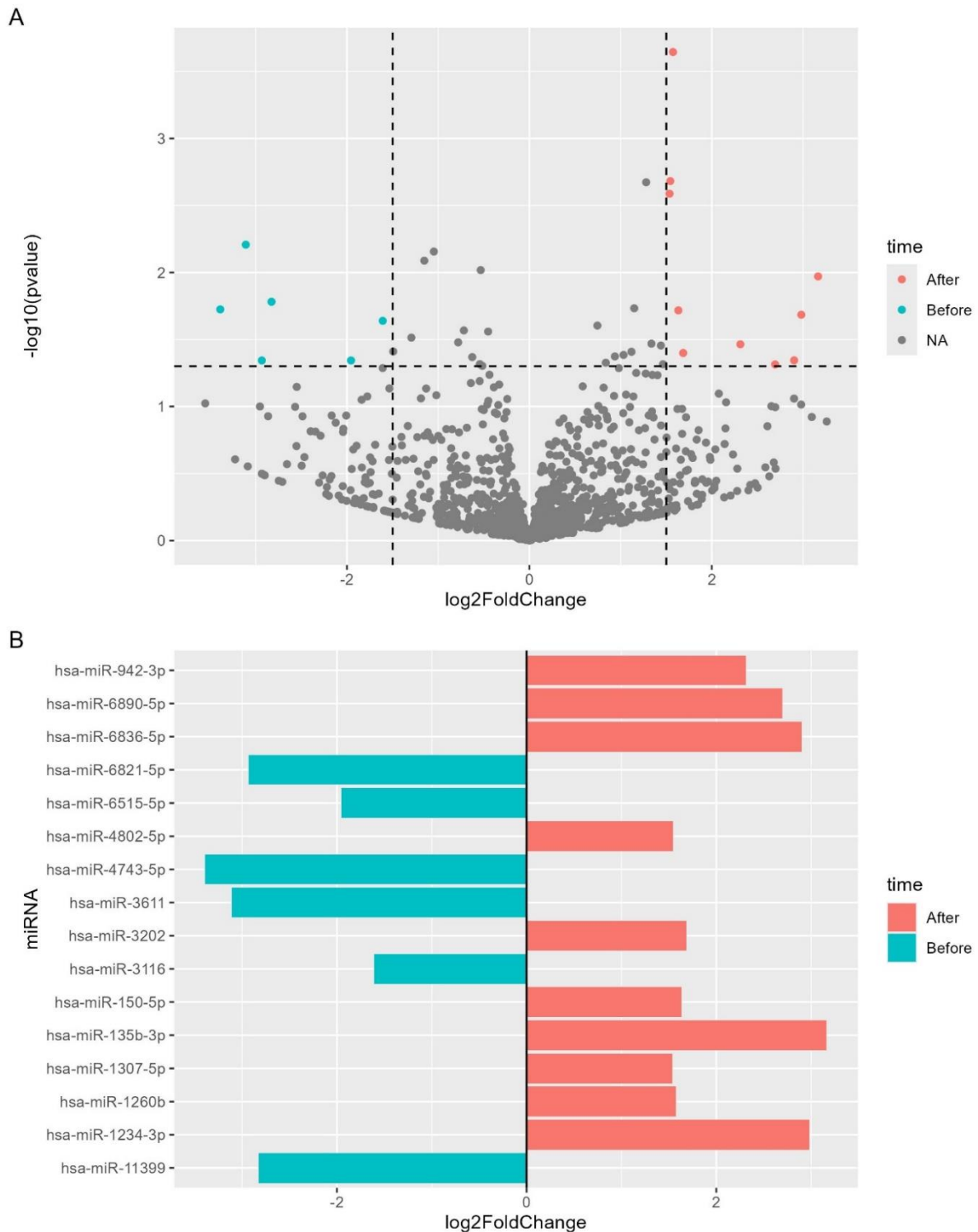
En los resultados del DESeq, se generaron dos tipos de gráficos para el análisis de abundancia diferencial, un Volcano plot que muestra la variación de los miRNAs en los grupos muestrales before (Azul) y after (Naranja), el eje X indica  $\log_2$  fold change y el eje y muestra  $-\log_{10}$  de pvalue. El gráfico de barras indica que los miRNAs miR.942-3p, miR-6890-5p, miR-6836-5p, miR-4802-5p, miR-3202, miR-150-5p, miR-135b-3p, miR-1307-5p, miR-1260b y miR-1234-3p son más abundantes en el grupo After (Naranja) y los miRNAs miR-6821-5p, miR-6515-5p, miR-4743-5p, miR-3611, miR-3116 y miR-11399 en el grupo Before (Azul) (Figura 5).

### **ALDEX**

El grafico volcano plot, las líneas representan un valor p predictivo posterior de 0.001 y una diferencia de 1.5 veces. Las características que no son significativas están en gris, los puntos naranjas muestran representan el grupo After y los puntos azules representan el grupo Before. El grafico de barras muestra los miRNAs más representados en cada uno de los grupos muestrales, donde podemos ver que el miRNA miR-6755-5p es más abundantes en el grupo after (Naranja) y los miRNAs miR-627-3p, miR-4802-5p y miR-3202 en el grupo Before (Azul) (Figura 6).

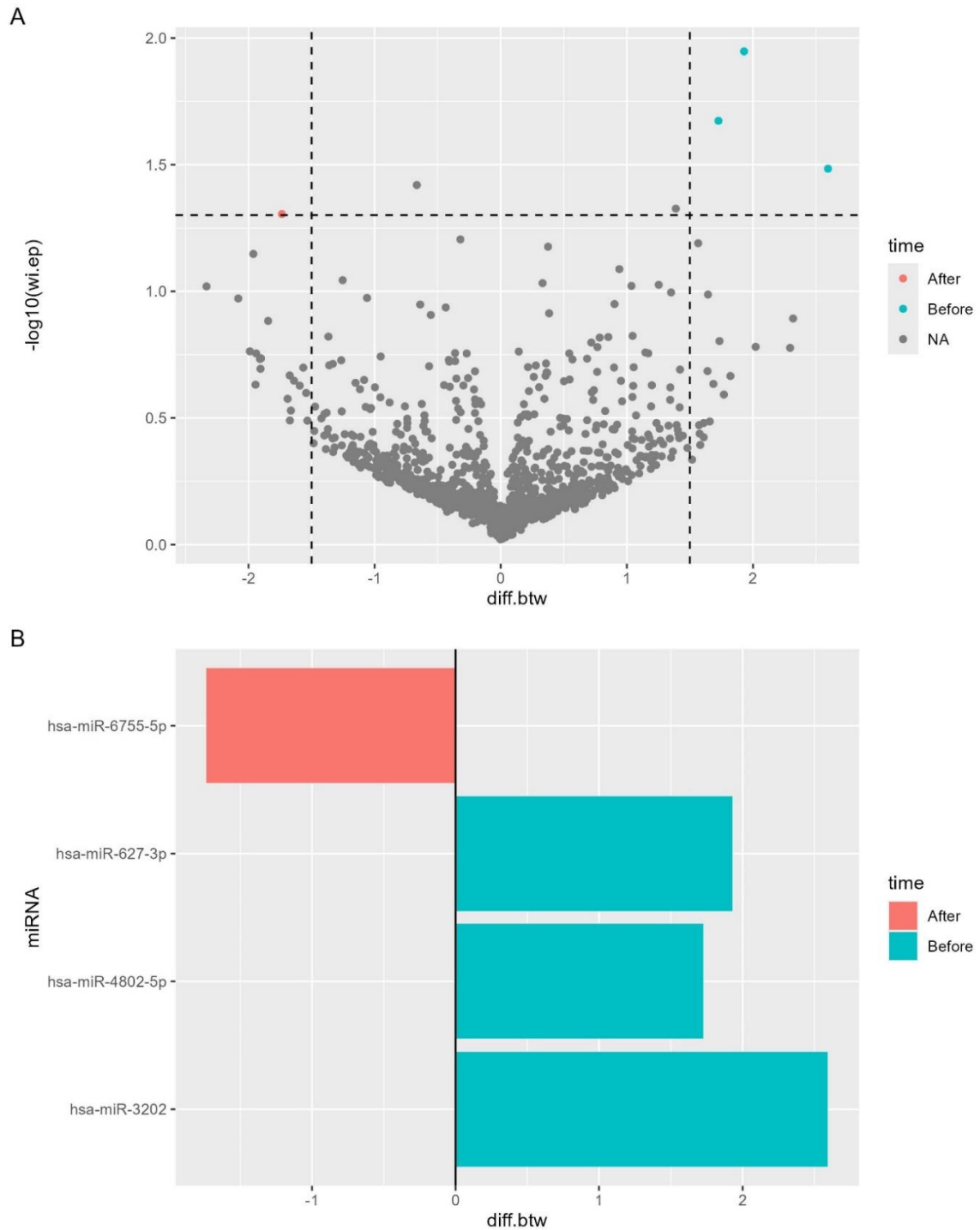
### **DEGER**

El gráfico volcano plots, las líneas representan un valor p predictivo posterior de 0.001 y una diferencia de 1.5 veces. Las características que no son significativas están en gris, los puntos naranjas muestran representan el grupo After y los puntos azules representan el grupo Before. Los miRNAs, miR-451a, miR-409-3p, miR-184 es más abundantes en el grupo after y los miRNAs miR-7705, miR-582-3p, miR-150-5p y miR-142-3p en el grupo Before (Figura 7).

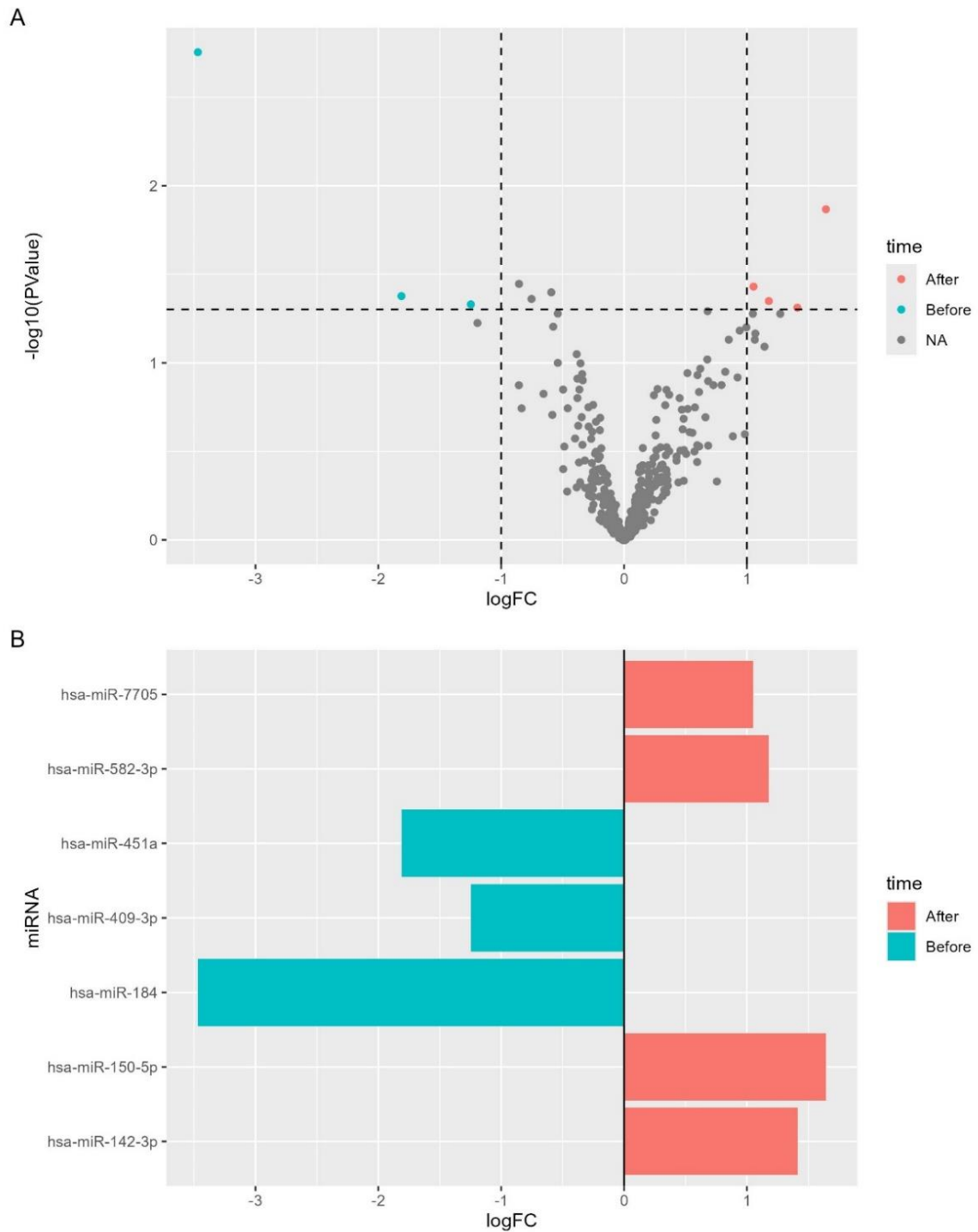


**Figura 5:** Resultados de expresión diferencial utilizando DESeq. **(A)** Volcano-plot en el que podemos ver la distribución de los miRNAs Before (Azul) y After (Naranja), eje Y indica el pvalue, el eje X muestra log2FoldChange. **(B)** Gráfico de Barras muestran la expresión de los miRNAs diferenciales para cada tipo de muestra, eje Y indica la etiqueta de los miRNAs, eje X indica log2FoldChange.





**Figura 6:** Resultados de expresión diferencial utilizando ALDEx muestras Before en Azul, muestras After en Naranja. **(A)** Volcano-plot, muestra la distribución diferencial de los miRNAs en las muestras de Leche. Eje Y indica  $w_i.ep$ , eje X muestra  $diff.btw$ . **(B)** Gráfico de Barras muestra la expresión de los miRNAs en cada tipo de muestra. eje Y indica la etiqueta de los miRNAs, eje X indica  $diff.btw$ .



**Figura 7:** Resultados de análisis de expresión diferencial utilizando *degeR*. **(A)** Volcano-plot en el que se muestra la distribución de los miRNAs de las muestras Before (Azul) y After (Naranja), eje Y indica el PValue, mientras que el eje X logFC. **(B)** Gráfico de barras muestra la expresión de los miRNAs altamente expresados en las muestras de Leche, eje Y indica la etiqueta de los miRNAs, eje X indica logFc.

## DISCUSIÓN

La lactancia materna es una de las medidas más importantes para la mejora de la salud de las infancias. La leche materna tiene una composición única que ha evolucionado y se ha adaptado a las necesidades de los lactantes, contiene componentes inmunológicos, bioquímicos y celulares que tienen potencial positivo en la inmunidad del neonato, además, de ser vinculada como promotor de modificaciones epigenéticas a través de sus componentes bioactivos, tales como factores de crecimiento, microbiota, las células madre, los miRNAs (Gialeli et al., 2023; Witkowska-Zimny & Kaminska-El-Hassan, 2017).

### **Detección de miRNAs en las muestras de binomios por qPCR**

Los resultados obtenidos nos indican la presencia de miRNAs en muestras de RNA total en muestras de leche y copro de Neonato. Se muestra de manera determinante la presencia de los miRNAs, miR-21 y miR-146 en ambos tipos de muestras proporcionando evidencia de la existencia de la transmisión vertical. Esto va de la mano con los datos presentados por Velez-Ixta y cols., (Vélez-Ixta et al., 2022), indicando la expresión relativa del miR-146 en muestras de RNA total extraídas de Leche Materna Humana de mujeres sanas de entre 0 y 7 días postparto. De igual manera, Floris y cols., (Floris et al., 2015) detectaron la expresión de miR-21, miR-146, miR-16 y let-7d en muestras de leche materna y en leche fraccionada, recolectadas en el segundo mes de lactancia de cuatro meses. Sin embargo, se necesita finalizar con la metodología y análisis propuestos en los resultados de secuenciación de miRNAs para así determinar de manera asertiva la existencia de la transmisión vertical.

### **Análisis *in silico* de secuencias de miRNAs obtenidas de bases de datos**

Los resultados obtenidos por el Heat Map realizado con el total de lecturas de miRNAs halladas en las muestras, podemos notar que no existe diferencia global entre muestras, es decir, no se define una agrupación por muestras sin correlación de la expresión de miRNAs encontrados en la leche, por el contrario, los datos mostrados por Alsaweed y cols., (Alsaweed et al., 2016) muestran la relación de expresión de 10 miRNAs más expresados en las muestras de leche antes y

después de la alimentación, las cuales se agruparon con una fuerte correlación. Estos datos se muestran diferentes a los obtenidos en el análisis sin embargo podemos tomar en cuenta la dimensión de los miRNAs utilizados para realizar el análisis.

### **miRNAs más abundantes en las muestras de leche**

Los datos obtenidos del gráfico de los miRNAs más abundantes en las muestras de leche antes y después de alimentar al neonato, podemos visualizar que ambos grupos presentan los mismos miRNAs, variando levemente la abundancia de los mismos entre muestras, donde pudimos ver que están presentes los siguientes miRNAs, ordenados de mayor a menor abundancia, let-7f-5p, miR-181a-5p, miR-148a-3p, miR-182-5p, let-7a-5p, miR-375-3p, miR-141-3p, miR-30a-5p, miR-92a-3p, miR-22-3p, miR-30d-5p, miR-146b-5p, miR-26a-5p, miR-21-5p y let-7i-5p. Una investigación realizada por (van Herwijnen y cols., (van Herwijnen et al., 2018) en vesículas extracelulares derivadas de leche humana encontraron mayor presencia de los miRNAs, let-7f-5p, miR-181a-5p, 148a-3p, miR-182-5p, let-7a-5p, miR-375-3p, miR-141-3p, miR-30a-5p, miR-92a-3p, miR-22-3p, miR-146b-5p y miR-26a-5p. Por otro lado, Rubio y cols., (Rubio et al., 2018) en un estudio realizado para la identificación de los miRNAs circulantes en leche humana mediante secuenciación masiva, indican que los miRNAs, let-7f-5p, miR-30a-5p, miR-22-3p, miR-26a-5p, miR-21-5p, let-7i-5p comprendieron >70% de expresión en sus muestras de Leche. Por su parte Golan-Gerstl y cols., (Golan-Gerstl et al., 2017), en su trabajo determinaron el perfil de expresión de miRNAs en leche humana y de otros mamíferos, mediante el empleo de secuenciación de próxima generación y el análisis de PCR cuantitativa en tiempo real, obteniendo como resultado para las muestras de leche humana los miRNAs más abundantes fueron miR-148a-3p, let-7a-5p, miR-30a-5p, miR-30d-5p, miR-146b-5p, miR-21-5p. Todos estos resultados obtenidos por diversos autores concuerdan con nuestros resultados indicando que los miRNAs más abundantes encontrados en nuestro estudio han tenido una mayor expresión en otros grupos de investigación, de la misma manera concuerdan con los datos del artículo original, debido a que en sus resultados muestran el top de

los 20 miRNAs conocidos más abundantes y en lo cual concordamos con nuestro top 15.

### **Análisis Diferencial de la Expresión de los miRNAs en muestras de Leche antes y después de la alimentación**

Los resultados obtenidos en el análisis diferencial, DESeq, identificamos la composición de los miRNAs en leche materna; un dato importante a tomar en cuenta en las lecturas de secuenciación del artículo original es que, descubrieron un total de 1996 especies de miRNA como miRNA nuevos en las muestras, de los cuales se identificaron 961 miRNA nuevos (14.202 lecturas) en Antes de la alimentación, mientras que 1215 miRNA nuevos (17.121 lecturas) en muestras después de la alimentación (Alsaweed et al., 2016).

Los resultados obtenidos en el DESeq muestran la presencia de los miRNAs miR.942-3p, miR-6890-5p, miR-6836-5p, miR-4802-5p, miR-3202, miR-150-5p, miR-135b-3p, miR-1307-5p, miR-1260b y miR-1234-3p diferencialmente expresado en muestra de leche posterior a la alimentación, y los miRNAs, miR-6821-5p, miR-6515-5p, miR-4743-5p, miR-3611, miR-3116 y miR-11399 encontrados en las muestras antes de la alimentación. Sin embargo, estos miRNAs no han sido relacionado con la Leche materna. No obstante, están relacionados en otros procesos celulares como el caso del miR.942-3p (W. Liu et al., 2022), el cual sugiere que puede ser un marcador del cáncer gástrico relacionado a las vías de señalización del gen AR y de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK)/quinasa regulada por señal extracelular (ERK). A su vez miR-6836-5p ha sido implicado en la biología de la Aneurisma de aorta torácica (TAA), dado que se cree que los biomarcadores de esta enfermedad (CDH5, CALCRL, ACVRL1, WARS, JUP, PTPRJ, P2RX4 y KDR son objetivos de este miRNA (Magouliotis et al., 2022). Un trabajo realizado por T. Yu y cols., (T. Yu et al., 2017), sugiere que miR-4802-5p tiene como objetivo específico las regiones 3'UTR de los genes ULK1 y ATG7, que son elementos de señalización de la autofagia en células de Cáncer colorrectal. Por otra parte, se ha asociado la promoción de la apoptosis de las Células endoteliales (CE) inducida por condiciones de hiperglucemia depende

de la orientación del miR-3202 hacia la molécula inhibidora de la apoptosis Fas2 (FAIM2) (Huang et al., 2017). miR-150-5p se ha visto altamente expresado y específico para las células del sistema hematopoyético que se acumulan en la leucemia aguda y el linfoma (Landgraf et al., 2007). La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica y compleja de la piel con lesiones que muestran perfiles de expresión de ARNm drásticamente alterados, donde los miRNAs influyen en la patogénesis de la enfermedad, como son angiogénesis, la inflamación y la diferenciación epidérmica, proceso en el que se ha indicado la influencia del miR-135b-3p (Joyce et al., 2011). En el trabajo realizado por Y. Liu y cols., (Y. Liu et al., 2018) mediante el estudio de asociación de todo el genoma, GWAS, por sus siglas en inglés, se relacionó al miR-1307-5p a un locus asociado a la esquizofrenia. Por parte del miR-126b, se ha encontrado que los niveles de expresión de este miRNA han sido significativamente más altos en pacientes con cáncer de ovario en comparación con los niveles encontrados con el grupo control (Ghafour et al., 2021). En un estudio donde se realizó el perfil de miRNAs en las vesículas extracelulares de líquido sinovial humano en pacientes con Osteoartritis se demostró que el miR-6821-5p se regulaban negativamente, mientras que otro como miR-16-2-3p, sugiriendo que los miRNAs transportados por vesículas extracelulares del líquido sinovial se alteran con la condición (Kolhe et al., 2017). Por su parte la expresión diferencial del miR-6515-5p fue asociada a los genes CSNK2A2 y Roca2 importantes en la vía de señalización del cáncer colorrectal (Slattery et al., 2017).

Los datos obtenidos por ALDEx muestran la expresión diferencial de los miRNAs a cada tipo de muestra, entre los que encontramos al, miR-6755-5p encontrado diferencialmente en el grupo before, mientras que, en el grupo after se expresan los miR-627-3p, 4802-5p y miR-3202, estos dos últimos encontrados en la prueba DESeq con mayor abundancia en el grupo after de la misma manera. El miR- 6755-5p se ha hallado regulado positivamente en los tejidos de Carcinoma Hepatocelular (HCC) relacionado con el virus de la hepatitis B (VHB), también el nivel de este miRNA se presentó altamente regulado en las células HepG2 y HepG2.2.15 (K. Yu et al., 2022).

Los resultados de degeR muestran los miRNAs con mayor expresión para el grupo antes del amamantamiento, miR-451a, miR-409-3p, miR-184, miR-7705, mientras que, los relacionados al grupo after son miR-582-3p, miR-150-5p, miR-142-3p. Por su parte el miR-451a se ha sido descrito como un supresor tumoral en células de glioma humano (Nan et al., 2010). Mientras que miR- 582-3p se correlaciona con la supervivencia de los pacientes con células madre cancerosas, la sobreexpresión de este miRNA funciona como regulador negativo de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina la cual participa en la autorrenovación y la resistencia a fármacos de las células madre de leucemia (Fang et al., 2015). Y miR- 142-3p se ha indicado que encuentra en la unión del punto de ruptura de una translocación t(8;17) en el cromosoma 17, que causa una leucemia agresiva de células B debido a la fuerte regulación positiva del gen oncogénico, MYC translocado (Lagos-Quintana et al., 2002).

Estos resultados son indicativos en como la diversidad de miRNAs varía en el tiempo de lactancia, pues el contenido de miRNAs es más robusto en la leche posterior a la alimentación del bebé.

## CONCLUSIÓN

Los datos hasta ahora alcanzados en la determinación de la transmisión vertical de los miRNAs de la leche materna al neonato a través del amamantamiento, brindan información válida de la existencia de esta, ya que los resultados de qPCR muestran similitud en la presencia de miRNAs en las muestras de meconio y en el copro de neonato.

De acuerdo con los datos obtenidos del análisis bioinformático *in sillico* de miRNAs obtenidos a través de muestras de Leche y tomando como referencia los datos reportados por (Alsaweed et al., 2016), quienes indican que si existe diferencias en la expresión de miRNAs entre las muestras antes y después de la alimentación.

Por nuestra parte, podemos apoyar los resultados presentados en el artículo original, ya que debido a la información brindada por los análisis de expresión diferencial realizados en este trabajo se demuestra que, si existen una diferencia en la composición de miRNAs entre muestras antes y después de alimentar al neonato, ya que se puede observar una diferencia significativa en la expresión de miRNAs y el número de ellos encontrados entre los tiempos de las muestras.



## **PERSPECTIVAS**

- Finalizar la etapa de secuenciamiento de las muestras de leche materna humana y copro de neonato utilizando la tecnología de NEXSEQ 500.
- Obtener las secuencias de miRNAs encontrados en las muestras para posteriormente realizar el análisis bioinformático de las secuencias. Siguiendo el pipeline propuesto en esta tesis.
- Proporcionar evidencia al proceso de transmisión vertical de los miRNAs de la Leche materna humana al neonato, esto mediante el proceso de amamantamiento.

## APÉNDICE

Durante el proceso de mi formación como Maestro en Ciencias en la Especialidad de Genética y Biología molecular, pude aprender a desarrollar las siguientes técnicas en el laboratorio.

Extracción de RNA

Extracción de DNA

PCR

QPCR

Qubit

Nanodrop

Geles de agarosa

Geles de poliacrilamida

Protocolo de RNA Integrity Number

Lenguaje R

Qiime

Manejo de Cluster de manera remota

Manejo de bases de datos

Gestión de Reactivos de Laboratorio

Lo que resultó en mi participación en proyectos realizados junto al equipo de trabajo del laboratorio, como lo son:

***Trabajo publicado:*** Vélez-Ixta, J. M., Juárez-Castelán, C. J., Ramírez-Sánchez, D., Lázaro-Pérez, N. D. S., Castro-Arellano, J. J., Romero-Maldonado, S., Rico-Arzate, E., Hoyo-Vadillo, C., Salgado-Mancilla, M., Gómez-Cruz, C. Y., Krishnakumar, A., Piña-Escobedo, A., Benitez-Guerrero, T., Pizano-Zárate,

M. L., Cruz-Narváez, Y., & García-Mena, J. (2024). Post Natal Microbial and Metabolite Transmission: The Path from Mother to Infant. *Nutrients*, 16(13), 1990. <https://doi.org/10.3390/nu16131990>

***Trabajo en revisión por la revista Immunology Letters:*** Karina Corona-Cervantes, Erick Sánchez-Salguero, Paola Berenice Zárate-Segura, Aparna Krishnakumar, Alberto Piña-Escobedo, Martín Noé Rangel-Calvillo, Tito Ramírez-Lozada, Gustavo Acosta-Altamirano, **Noemí del Socorro Lázaro-Pérez**, Mónica Sierra-Martínez, Leopoldo Santos Argumedo, Jaime García Mena. (--) Maternal immunoglobulins differentially bind a diverse bacterial community in human colostrum and the stool of breastfed neonates.

***Trabajo en proceso:*** Recurrent Vulvovaginal Candidiasis Associates to Vaginal Microbiota Dysbiosis.

Resultados preliminares del proyecto fueron presentados en el International Scientific Conference Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota And Health (IPC), llevado a cabo del 18-20 de junio del 2024 en Praga, República Checa.

## REFERENCIAS

- Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E. P. A., Scheynius, A., & Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology*, 179(3), 1969-1978. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1969>
- Ahmed, F. E., Gouda, M. M., Hussein, L. A., Ahmed, N. C., Vos, P. W., & Mohammad, M. A. (2017). Role of Melt Curve Analysis in Interpretation of Nutrigenomics' MicroRNA Expression Data. *Cancer Genomics & Proteomics*, 14(6), 469-481.
- Alex, A., Bhandary, E., & McGuire, K. P. (2020). Anatomy and Physiology of the Breast during Pregnancy and Lactation. En S. Alipour & R. Omranipour (Eds.), *Diseases of the Breast during Pregnancy and Lactation* (pp. 3-7). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-41596-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-41596-9_1)
- Alsaweed, M., Hepworth, A. R., Lefèvre, C., Hartmann, P. E., Geddes, D. T., & Hassiotou, F. (2015). Human Milk MicroRNA and Total RNA Differ Depending on Milk Fractionation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(10), 2397-2407. <https://doi.org/10.1002/jcb.25207>
- Alsaweed, M., Lai, C. T., Hartmann, P. E., Geddes, D. T., & Kakulas, F. (2016). Human milk miRNAs primarily originate from the mammary gland resulting in unique miRNA profiles of fractionated milk. *Scientific Reports*, 6(1), 20680. <https://doi.org/10.1038/srep20680>
- 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>
- Buckley, A., & Turner, J. R. (2018). Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1), a029314. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029314>
- Carr, L. E., Virmani, M. D., Rosa, F., Munblit, D., Matazel, K. S., Elolimy, A. A., & Yeruva, L. (2021). Role of Human Milk Bioactives on Infants' Gut and Immune Health. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.604080>
- Christian, P., Smith, E. R., Lee, S. E., Vargas, A. J., Bremer, A. A., & Raiten, D. J. (2021). The need to study human milk as a biological system. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 113(5), 1063-1072. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab075>
- Fang, L., Cai, J., Chen, B., Wu, S., Li, R., Xu, X., Yang, Y., Guan, H., Zhu, X., Zhang, L., Yuan, J., Wu, J., & Li, M. (2015). Aberrantly expressed miR-582-3p maintains lung cancer stem cell-like traits by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nature Communications*, 6(1), 8640. <https://doi.org/10.1038/ncomms9640>

- Farah, E., Barger, M. K., Klima, C., Rossman, B., & Hershberger, P. (2021). Impaired Lactation: Review of Delayed Lactogenesis and Insufficient Lactation. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 66(5), 631-640. <https://doi.org/10.1111/jmwh.13274>
- Fernandes, A. D., Macklaim, J. M., Linn, T. G., Reid, G., & Gloor, G. B. (2013). ANOVA-Like Differential Expression (ALDEx) Analysis for Mixed Population RNA-Seq. *PLOS ONE*, 8(7), e67019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067019>
- Floris, I., Billard, H., Boquien, C.-Y., Joram-Gauvard, E., Simon, L., Legrand, A., Boscher, C., Rozé, J.-C., Bolaños-Jiménez, F., & Kaeffer, B. (2015). MiRNA Analysis by Quantitative PCR in Preterm Human Breast Milk Reveals Daily Fluctuations of hsa-miR-16-5p. *PLOS ONE*, 10(10), e0140488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140488>
- Garofalo, R. (2010). Cytokines in Human Milk. *The Journal of Pediatrics*, 156(2, Supplement), S36-S40. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.019>
- Garwolińska, D., Namieśnik, J., Kot-Wasik, A., & Hewelt-Belka, W. (2018). Chemistry of Human Breast Milk—A Comprehensive Review of the Composition and Role of Milk Metabolites in Child Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(45), 11881-11896. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04031>
- Ghafour, A. A., Odemis, D. A., Tuncer, S. B., Kurt, B., Saral, M. A., Erciyas, S. K., Erdogan, O. S., Celik, B., Saip, P., & Yazici, H. (2021). High expression level of miR-1260 family in the peripheral blood of patients with ovarian carcinoma. *Journal of Ovarian Research*, 14(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13048-021-00878-x>
- Gialeli, G., Panagopoulou, O., Liosis, G., & Siahianidou, T. (2023). Potential Epigenetic Effects of Human Milk on Infants' Neurodevelopment. *Nutrients*, 15(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/nu15163614>
- 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), 1700009. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700009>
- Gu, Z. (2022). Complex heatmap visualization. *iMeta*, 1(3), e43. <https://doi.org/10.1002/imt2.43>
- Huang, X., Xie, H., Xue, G., Ye, M., & Zhang, L. (2017). MiR-3202 – Promoted H5V Cell Apoptosis by Directly Targeting Fas Apoptotic Inhibitory Molecule 2 (FAIM2) in High Glucose Condition. *Medical Science Monitor*, 23, 975-983. <https://doi.org/10.12659/MSM.899443>
- Huffman, S. L., Zehner, E. R., & Victora, C. (2001). Can improvements in breast-feeding practices reduce neonatal mortality in developing countries? *Midwifery*, 17(2), 80-92. <https://doi.org/10.1054/midw.2001.0253>

- Joyce, C. E., Zhou, X., Xia, J., Ryan, C., Thrash, B., Menter, A., Zhang, W., & Bowcock, A. M. (2011). Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. *Human Molecular Genetics*, 20(20), 4025-4040. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr331>
- Jozsa, F., & Thistle, J. (2024). Anatomy, Colostrum. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513256/>
- Kaeffer, B. (2023). Human Breast Milk miRNAs: Their Diversity and Potential for Preventive Strategies in Nutritional Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/ijms242216106>
- Kapourchali, F. R., & Cresci, G. A. M. (2020). Early-Life Gut Microbiome—The Importance of Maternal and Infant Factors in Its Establishment. *Nutrition in Clinical Practice*, 35(3), 386-405. <https://doi.org/10.1002/ncp.10490>
- Kolhe, R., Hunter, M., Liu, S., Jadeja, R. N., Pundkar, C., Mondal, A. K., Mendhe, B., Drewry, M., Rojiani, M. V., Liu, Y., Isales, C. M., Guldborg, R. E., Hamrick, M. W., & Fulzele, S. (2017). Gender-specific differential expression of exosomal miRNA in synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Scientific Reports*, 7(1), 2029. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01905-y>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2002). Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Current Biology*, 12(9), 735-739. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00809-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00809-6)
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foà, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., ... Tuschl, T. (2007). A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell*, 129(7), 1401-1414. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.040>
- Lawrence, R. A. (2022). 4—Biochemistry of Human Milk. En R. A. Lawrence & R. M. Lawrence (Eds.), *Breastfeeding (Ninth Edition)* (pp. 93-144). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-68013-4.00004-3>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00361>
- Liao, Q., Wang, B., Li, X., & Jiang, G. (2016). miRNAs in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 8(2), 3666-3682. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12343>
- Liu, S., da Cunha, A. P., Rezende, R. M., Cialic, R., Wei, Z., Bry, L., Comstock, L. E., Gandhi, R., & Weiner, H. L. (2016). The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA. *Cell Host & Microbe*, 19(1), 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.005>
- Liu, W., Ying, N., Rao, X., & Chen, X. (2022). MiR-942-3p as a Potential Prognostic Marker of Gastric Cancer Associated with AR and MAPK/ERK Signaling

- Pathway. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/cimb44090263>
- Liu, Y., Chang, X., Hahn, C.-G., Gur, R. E., Sleiman, P. A. M., & Hakonarson, H. (2018). Non-coding RNA dysregulation in the amygdala region of schizophrenia patients contributes to the pathogenesis of the disease. *Translational Psychiatry*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41398-017-0030-5>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lyons, K. E., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Ross, R. P., & Stanton, C. (2020). Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients*, 12(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/nu12041039>
- Magouliotis, D. E., Fergadi, M. P., Christodoulidis, G., Svokos, A. A., Svokos, K. A., Bareka, M., & Athanasiou, T. (2022). In-depth bioinformatic study of the cadherin 5 interactome in patients with thoracic aortic aneurysm unveils 8 novel biomarkers. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 61(1), 11-18. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezab338>
- Melnik, B. C., Stremmel, W., Weiskirchen, R., John, S. M., & Schmitz, G. (2021). Exosome-Derived MicroRNAs of Human Milk and Their Effects on Infant Health and Development. *Biomolecules*, 11(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/biom11060851>
- Moloney, G. M., Viola, M. F., Hoban, A. E., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2018). *Faecal microRNAs: Indicators of imbalance at the host-microbe interface?* <https://doi.org/10.3920/BM2017.0013>
- Nan, Y., Han, L., Zhang, A., Wang, G., Jia, Z., Yang, Y., Yue, X., Pu, P., Zhong, Y., & Kang, C. (2010). MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells. *Brain Research*, 1359, 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.074>
- Newburg, D. S., & Walker, W. A. (2007). Protection of the Neonate by the Innate Immune System of Developing Gut and of Human Milk. *Pediatric Research*, 61(1), 2-8. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000250274.68571.18>
- Nommsen-Rivers, L. A., Dolan, L. M., & Huang, B. (2012). Timing of Stage II Lactogenesis Is Predicted by Antenatal Metabolic Health in a Cohort of Primiparas. *Breastfeeding Medicine*, 7(1), 43-49. <https://doi.org/10.1089/bfm.2011.0007>
- Notarbartolo, V., Giuffrè, M., Montante, C., Corsello, G., & Carta, M. (2022). Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*, 25(3), 194-210. <https://doi.org/10.5223/pghn.2022.25.3.194>

- O'Reilly, D., Dorodnykh, D., Avdeenko, N. V., Nekliudov, N. A., Garssen, J., Elolimy, A. A., Petrou, L., Simpson, M. R., Yeruva, L., & Munblit, D. (2020). Perspective: The Role of Human Breast-Milk Extracellular Vesicles in Child Health and Disease. *Advances in Nutrition*, 12(1), 59-70. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa094>
- Palmeira, P., & Carneiro-Sampaio, M. (2016). Immunology of breast milk. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 62, 584-593. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.62.06.584>
- Pang, W. W., & Hartmann, P. E. (2007). Initiation of Human Lactation: Secretory Differentiation and Secretory Activation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(4), 211-221. <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9054-4>
- Pillay, J., & Davis, T. J. (2024). Physiology, Lactation. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499981/>
- Ponnusamy, V., & Yip, P. K. (2019). The role of microRNAs in newborn brain development and hypoxic ischaemic encephalopathy. *Neuropharmacology*, 149, 55-65. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.041>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rodríguez, J. M., Fernández, L., & Verhasselt, V. (2021). The Gut–Breast Axis: Programming Health for Life. *Nutrients*, 13(2), 606. <https://doi.org/10.3390/nu13020606>
- Rubio, M., Bustamante, M., Hernandez-Ferrer, C., Fernandez-Orth, D., Pantano, L., Sarria, Y., Piqué-Borras, M., Vellve, K., Agramunt, S., Carreras, R., Estivill, X., Gonzalez, J. R., & Mayor, A. (2018). Circulating miRNAs, isomiRs and small RNA clusters in human plasma and breast milk. *PLOS ONE*, 13(3), e0193527. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193527>
- Santiago-Cruz, R. M., Alvarado-de Luzuriaga, E., Monroy-Azuara, M. G., Arciga-Vázquez, G. S., Cano-Vázquez, E. N., Cruz-Apanco, U., Palma-Jiménez, I., & Méndez-Martínez, S. (2019). [Breastfeeding and infant feeding in the first level of attention]. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 57(6), 387-394.
- Slattery, M. L., Mullany, L. E., Sakoda, L. C., Samowitz, W. S., Wolff, R. K., Stevens, J. R., & Herrick, J. S. (2017). Expression of Wnt-signaling pathway genes and their associations with miRNAs in colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(5), 6075-6085. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23636>
- Tingö, L., Ahlberg, E., Johansson, L., Pedersen, S. A., Chawla, K., Sætrom, P., Cione, E., & Simpson, M. R. (2021). Non-Coding RNAs in Human Breast Milk: A Systematic Review. *Frontiers in Immunology*, 12, 725323. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.725323>



- Truchet, S., & Honvo-Houéto, E. (2017). Physiology of milk secretion. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31(4), 367-384. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.008>
- van Herwijnen, M. J. C., Driedonks, T. A. P., Snoek, B. L., Kroon, A. M. T., Kleinjan, M., Jorritsma, R., Pieterse, C. M. J., Hoen, E. N. M. N.-'t, & Wauben, M. H. 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.2018.00081>
- van Herwijnen, M. J. C., Zonneveld, M. I., Goerdayal, S., Nolte – 't Hoen, E. N. M., Garssen, J., Stahl, B., Maarten Altelaar, A. F., Redegeld, F. A., & Wauben, M. H. M. (2016). Comprehensive Proteomic Analysis of Human Milk-derived Extracellular Vesicles Unveils a Novel Functional Proteome Distinct from Other Milk Components\*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(11), 3412-3423. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.060426>
- Vélez-Ixta, J. M., Benítez-Guerrero, T., Aguilera-Hernández, A., Martínez-Corona, H., Corona-Cervantes, K., Juárez-Castelán, C. J., Rangel-Calvillo, M. N., & García-Mena, J. (2022). Detection and Quantification of Immunoregulatory miRNAs in Human Milk and Infant Milk Formula. *BioTech*, 11(2), 11. <https://doi.org/10.3390/biotech11020011>
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733-1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Witkowska-Zimny, M., & Kaminska-El-Hassan, E. (2017). Cells of human breast milk. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 22(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s11658-017-0042-4>
- Yi, D. Y., & Kim, S. Y. (2021). Human Breast Milk Composition and Function in Human Health: From Nutritional Components to Microbiome and MicroRNAs. *Nutrients*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/nu13093094>
- Yu, K., Mei, Y., Wang, Z., Liu, B., & Deng, M. (2022). LncRNA LINC00924 upregulates NDRG2 to inhibit epithelial-mesenchymal transition via sponging miR-6755-5p in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Journal of Medical Virology*, 94(6), 2702-2713. <https://doi.org/10.1002/jmv.27578>
- Yu, T., Guo, F., Yu, Y., Sun, T., Ma, D., Han, J., Qian, Y., Kryczek, I., Sun, D., Nagarsheth, N., Chen, Y., Chen, H., Hong, J., Zou, W., & Fang, J.-Y. (2017). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell*, 170(3), 548-563.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.008>