

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias
Biológicas

**LACTOBACILOS DE LECHE MATERNA
PARA EL DESARROLLO DE PROBIÓTICOS
PARA ALIMENTOS Y LA PROMOCIÓN DE
LA OFERTA TECNOLÓGICA DE CULTIVOS
NACIONALES**

Lic. Sofía Lorena Oddi

Director de Tesis: Dr. Gabriel Vinderola

Co-directora de Tesis: Dra. Patricia Burns

Instituto de Lactología Industrial – UNL – CONICET

-2021-

Agradecimientos:

.....

Quisiera agradecer a la Universidad Nacional del Litoral y en especial a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por darme la posibilidad de realizar mis estudios de grado y doctorado. A todos sus miembros, docentes y no docentes, que se esfuerzan día a día por construir y revalorizar la Universidad pública...

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por hacer posible la presente Tesis a través de su programa de becas doctorales.

A los miembros del Jurado, por el interés y tiempo dedicados a la evaluación de la misma.

A mi director, el Dr. Gabriel Vinderola, por motivarme a probar “nuevos aires” y sus esfuerzos para que esto fuera posible. Sin duda, tendrán un impacto positivo en mi crecimiento personal y académico.

A mi codirectora, la Dra. Patricia Burns, por sus consejos y ayuda a lo largo de mi doctorado.

Al Dr. Jorge Reinheimer por permitirme formar parte del INLAIN, brindarme su apoyo y compartirme su experiencia. A la Dra. Andrea Quiberoni, directora del INLAIN, por siempre su pronta respuesta.

A la Dra. Ana Binetti por ayudarme siempre con la mejor predisposición... Muchas gracias!

A la Dra. María Carmen Collado por hacer posible la secuenciación masiva del gen 16S ARNr de las muestras de leche materna del Cap. 1. Asimismo, por su buena predisposición.

A la Dra. Alejandra Cuatrín por ayudarme en el diseño experimental de los medios y estar presente cada vez que necesité su ayuda.

A Dra. Paula Huber, por su ayuda en el análisis de los datos de secuenciación. Pero aún más, por siempre estar ahí para explicarme y resolver mis dudas, y principalmente por transmitirme su pasión por su trabajo.

Al programa AUGM que me permitió realizar mi estadía en Brasil. En particular, a la Dra. Katia Sivieri por recibirme en su laboratorio y permitirme realizar una parte muy importante de este trabajo de tesis.

Al programa Erasmus que me permitió realizar mi estadía en Finlandia. En especial al Dr. Seppo Salminen por su buena predisposición. A la Dra. Hanna-Alakomi Lenna por su confianza siempre y compartir lindos momentos fuera del VTT, con ella y su familia.

Al Dr. Contini y la Lic. Irina Sosa por escucharnos y abrirnos las puertas del Hospital J. B. Iturraspe. A las enfermeras por su dedicación y darme una mano siempre. Por, sobre todo, a todas las mamás que, a pesar del delicado momento, colaboraron conmigo, jamás hubiera sido posible este trabajo sin ellas...

A toda la gente buena que me he cruzado en el camino... En especial a todas las técnicas que en donde vaya, me cuidan, me ayudan, me cocinan (je!) y valoran mi esfuerzo ... ¡Por sobre todo a mi técnica favorita Desi!

A toda la gente del INLAIN que, de alguna forma u otra, me ha ayudado y... bueno también por las charlas y los ricos mates: Dani, Manqui, Diego, Luján, Meli, Guille, Flor, Gabi, etc. Y sin que los demás se pongan celosos, a Eli por siempre darme una mano y escucharme en mis momentos más difíciles, muchas gracias!

A mis amigas de siempre, desde que el azar nos reunió en la querida EIS, Nati, Noe, Regi, Virgi y Neri. Siempre están ahí para escucharnos o solo para olvidarnos de todo con un par de cervezas frías o unos mates. Las quiero a todas muchísimo!

A Nati porque el camino nos cruzó, mientras hacia la tesina, y desde ese momento formamos el mejor equipo! Te quiero amiga!

A Ali porque a pesar de que solo estuviste pocos meses, tu amistad siempre está, aconsejándome, dándome ánimos. Estoy muy agradecida de haberte conocido trabajando y poder compartir mi pasión por la ciencia con vos. ¡Como siempre digo eres más que genial!

A mí FAMILIA, porque pase lo que pase, la familia siempre está para apoyarte, los quiero mucho. A mis tíos: Rauli, Viole por siempre darme una mano. A mi padrino, Jorge, por acercarme a la Lic. Irina Sosa y que, desde ese momento, se gestará el trabajo en el Hospital. A mi nona porque cuando no tengo más fuerza, te recuerdo y siento tu amor infinito...

A mi mamá, mi papá y mi hermano que siempre me cuidaron y dieron todo para que hoy este acá. ¡Los amo con todo mi corazón!

A mis dos mujercitas, mis ahijadas, que con sus sonrisas me alegran el día...Las amo!

A mi pequeña familia, Germán y tita (jaja)!! Bueno acá la lista se hace infinita, pero gracias por bancarme mis viajes, mis estados zombis-estrés... Te amo infinitamente y espero que la vida nos mantenga siempre juntos. Apoyándonos, siempre dándonos fuerzas para alcanzar nuestras metas... Te amo!

El camino no ha sido fácil, pero cuando pierdo toda esperanza, encuentro personas con gestos de amor, empatía, cariño, de conocidos y extraños...Esto me hace sentir afortunada y privilegiada de haber tenido la posibilidad de llegar hasta este preciso momento y lugar... Por eso agradezco al camino que me llevó estar aquí y ahora. ¡¡¡GRACIAS!!!

.....

Los resultados de esta tesis se encuentran parcialmente contenidos en los siguientes trabajos científicos-tecnológicos:

Publicaciones en revistas internacionales con referato:

S Oddi, A Binetti, P Burns, A Cuatrín, J Reinheimer, S Salminen, G Vinderola (2020) Occurrence of bacteria with technological and probiotic potential in Argentinian human breast-milk. *Benef Microbes*, 11 (7): 685 – 702.

S Oddi, P Huber, AL Rocha Faria Duque, G Vinderola, K Sivieri (2020) Breast-milk derived potential probiotics as strategy for the management of childhood obesity. *Food Res Int*, 137(109673): 1-9.

P Burns, S Oddi, L Forzani, E Tabacman, J Reinheimer, G Vinderola (2018) Variability in gut mucosal secretory IgA in mice along a working day. *BMC Research Notes* 11(98): 5.

AM Nogacka, S Oddi, N Salazar, JA Reinheimer, M Gueimonde, G Vinderola, CG de los Reyes-Gavilán (2019) Intestinal immunomodulation and shifts on the gut microbiota of BALB/c mice promoted by two *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains isolated from human samples (2019). *Bio Med Research International*, 2019: 8.

Otros aportes científicos-tecnológicos

En este trabajo de tesis doctoral se lograron aislar y caracterizar cepas de lactobacilos de leche materna, siendo una de las cepas caracterizadas en este trabajo objeto de un Acuerdo de Transferencia de Material Biológica con el grupo francés Pileje, firmado el 23 de Julio de 2020 (Expediente UNL REC-1029333-20) y gestionado por el Centro de Transferencia de los Resultados de Investigación (CETRI-Litoral, UNL). Este MTA tiene por objeto que se continúen los estudios de caracterización probiótica de *L plantarum* 73a, con vistas a un potencial licenciamiento para su aplicación y explotación comercial

Índice

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
1.LACTANCIA Y LECHE MATERNA.....	10
1.1. <i>Composición de la leche materna</i>	10
1.2. <i>La microbiota de la leche materna</i>	11
2.MICROBIOTA INTESTINAL.....	17
2.1. <i>Establecimiento y composición de la microbiota intestinal</i>	17
3.MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	21
3.1. <i>Probióticos: especies y potenciales beneficios</i>	21
3.2. <i>La leche materna como fuente potencial de probióticos</i>	25
3.3. <i>Aspectos tecnológicos y funcionales en la selección de bacterias probióticas</i>	26
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
CAPÍTULO 1.....	30
MICROBIOTA DE LECHE MATERNA EN MADRES DE BEBÉS A TÉRMINO VERSUS PREMATUROS.....	30
1.INTRODUCCIÓN.....	30
2.OBJETIVOS.....	31
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1 <i>Sujetos y muestreo de leche materna</i>	32
3.2 <i>Extracción de ADN y secuenciación de las muestras de leche materna</i>	33
3.3 <i>Análisis bioinformático de los datos de la secuenciación masiva</i>	33
3.4 <i>Análisis estadístico</i>	34
4.RESULTADOS.....	36
5.DISCUSIÓN.....	46
6.CONCLUSIÓN.....	51
CAPÍTULO 2.....	52
POTENCIAL PROBIÓTICO Y TECNOLÓGICO DE CEPAS AISLADAS DE LECHE MATERNA.....	52
1.INTRODUCCIÓN.....	53
2.OBJETIVOS.....	55
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
3.1 <i>Aislamiento de microorganismos de leche materna</i>	56
3.2 <i>Identificación de los aislamientos</i>	56
3.3 <i>Análisis de la diversidad genotípica</i>	57
3.4 <i>Ensayo de hidrofobicidad</i>	58

3.5	<i>Co-cultivos de macrófagos murinos con las cepas aisladas de leche materna</i>	58
3.6	<i>Resistencia a la liofilización y almacenamiento</i>	59
3.7	<i>Reformulación de un medio de cultivo para una producción costo-efectiva de biomasa</i>	60
3.8	<i>Ensayos in vivo</i>	62
	<i>Animales y cepas</i>	62
	<i>Capacidad protectora de las cepas L. gasseri 70c, L. plantarum 73a y 73b contra la infección por Salmonella Typhimurium</i>	63
	<i>Capacidad inmunomoduladora de L. plantarum 73a y L. plantarum 73b</i>	64
3.9	<i>Fermentación de productos comerciales de base vegetal</i>	65
3.10	<i>Análisis estadístico</i>	66
4.	RESULTADOS	68
4.1	<i>Aislamiento, identificación y diversidad genética de las cepas aisladas</i>	68
4.2	<i>Potencial probiótico de las cepas aisladas de leche materna</i>	70
4.3	<i>Resistencia a la liofilización y almacenamiento</i>	71
4.4	<i>Reformulación de un medio de cultivo para una producción costo-efectiva de biomasa</i>	80
4.5	<i>Ensayos in vivo</i>	82
4.6	<i>Fermentación de productos comerciales de base vegetal</i>	86
5.	DISCUSIÓN	89
6.	CONCLUSIÓN	96
CAPÍTULO 3		97
POTENCIAL USO DE BACTERIAS AISLADAS DE LECHE MATERNA COMO TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD INFANTIL		97
1.	INTRODUCCIÓN	98
2.	OBJETIVOS	100
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	101
3.1	<i>Cultivos bacterianos</i>	101
3.2	<i>Protocolo experimental del SHIME®</i>	101
3.3	<i>Análisis de ácidos grasos de cadena corta y los iones amonio</i>	104
3.4	<i>Determinación de la composición bacteriana mediante la secuenciación del gen 16S ARNr</i>	104
3.5	<i>Análisis bioinformático de los datos de la secuenciación masiva</i> ..	105
3.6	<i>Análisis estadístico</i>	106
4.	RESULTADOS	107
4.1	<i>Composición de bacteriana</i>	107
4.2	<i>Producción de metabolitos: ion amonio y ácidos grasos de cadena corta</i>	114
5.	DISCUSIÓN	117
6.	CONCLUSIÓN	123
CONCLUSIONES GENERALES		124
BIBLIOGRAFÍA		127

<i>ANEXO</i>	<i>159</i>
--------------------	------------

Abreviaturas y símbolos:

AGCC: Ácidos Grasos de Cadena Corta

a_w: siglas en inglés de *water activity* o actividad del agua

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

GRAS: siglas en inglés de *Generally Recognized As Safe*

HMOs: siglas en inglés de *Human Milk Oligosaccharides*

IMC: Índice de Masa Corporal

INF gamma: INterFerón gamma

ISAPP: siglas en inglés de *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*

L: Lactosa

MALDI-TOF-MS: siglas en inglés de *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*

MRS_c: caldo de cultivo MRS suplementado con 0,1 % (p/v) de L-cisteína

OTUs: siglas en inglés de *Operational Taxonomic Units*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PDX: PoliDeXtrosa

TNF: siglas en inglés de *Tumor Necrosis Factor* alfa

SIDA: Síndrome de InmunoDeficiencia Adquirida

SHIME®: siglas en inglés de *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UPGMA: siglas en inglés de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*

Resumen:

La leche materna es el mejor alimento para el bebé, desde su nacimiento hasta por lo menos sus dos primeros años de vida, según la Organización Mundial de la Salud. A través de la lactancia, las madres brindan a sus hijos nutrientes esenciales, células inmunes y compuestos bioactivos. Estos últimos, incluyen una microbiota única, individualizada y dinámica. La microbiota de la leche materna guía el desarrollo adecuado del sistema inmune, previniendo enfermedades de tipo respiratorias, infecciosas e inflamatorias. Los bebés prematuros (< 37 semanas de gestación) son los más comprometidos, en términos de salud, debido a su sistema inmune inmaduro. A nivel mundial, la prematuridad es la principal causa de mortalidad en niños menores de cinco años. Durante la hospitalización, los bebés prematuros tienen un mayor riesgo de padecer sepsis y enterocolitis necrotizante y, durante su infancia, complicaciones en su crecimiento y desarrollo cognitivo. Múltiples factores caracterizan la prematuridad, uno de ellos es la menor diversidad microbiana y los mayores niveles de potenciales patógenos en la microbiota intestinal de bebés prematuros, respecto a la de bebés nacidos a término. Microorganismos específicos de la leche materna son transferidos desde la madre a sus hijos mediante la lactancia. Cuando se analizaron pares de madre-hijo, se han identificado bacterias de la leche materna en las heces de los bebés. Estudios más recientes señalan que las diferencias entre la leche materna de madres de bebés nacidos a término y prematuros no solo abarcan su composición química, sino también su microbiota. Asimismo, la leche materna parece ser condicionada por la genética, la dieta y el medio ambiente.

Debido a las particularidades geográficas que presenta la microbiota, adquiere interés el hecho de estudiar la microbiota de la leche materna en Argentina, y sus diferencias entre la leche materna de bebés nacidos a término y prematuros. En el primer capítulo de esta tesis doctoral, mediante la secuenciación masiva del gen 16S ARNr analizamos la microbiota de la leche materna de madres de bebés a término y de bebés prematuros. Para este último grupo, se obtuvieron dos muestras, una dentro de los primeros días posparto y otra cuando el bebé hubiera alcanzado las 37 semanas de gestación. La diversidad alfa de la leche materna de bebés a término fue

significativamente mayor que la primera muestra de leche materna de bebés prematuros. Pero estas diferencias no se observaron cuando se compararon las muestras de leche materna de bebés a término con la segunda toma de muestra de bebés prematuros. Cuando se comparó la composición taxonómica del filo Firmicutes entre los grupos estudiados, se observó que la microbiota de la leche materna de las madres de bebés prematuros, al transcurrir los días, se asemejaba a la microbiota correspondiente a madres de bebés a término, aunque no así en referencia a los filos Proteobacteria y Actinobacteria. Los géneros más abundantes fueron *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Filo Firmicutes), y estos, a su vez, fueron los que más contribuyeron a las diferencias observadas. La relación de abundancia relativa de *Streptococcus/Staphylococcus* en leche materna fue mayor en bebés a término, en comparación con la de los bebés prematuros. Los niveles de *Rothia* fueron significativamente menores en el grupo de bebés prematuros, en comparación con los nacidos a término. Una disminución del género *Rothia* en la microbiota intestinal de niños, fue relacionada con un mayor riesgo a padecer asma en la adultez.

Considerando a la leche materna como una fuente reconocida de microorganismos beneficiosos, en el segundo capítulo de esta tesis, nos propusimos aislar e identificar bacterias a partir de muestras de leche materna. Se aislaron e identificaron lactobacilos y bifidobacterias, debido a su estatus de *Generally Recognized As Safe* para ser empleados como cultivos probióticos. En concordancia con los resultados obtenidos en el primer capítulo, los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* no fueron predominantes, aislándose 14 lactobacilos y una cepa de bifidobacterias a partir de 164 muestras de leche materna sembradas en agar MRS. Para la selección de nuevas cepas de probióticos, se consideró la funcionalidad y la aptitud tecnológica para ser incorporadas a los diferentes productos utilizados como matrices. En una primera etapa, se seleccionaron las cepas con mayor potencial antiinflamatorio, según los resultados obtenidos de los co-cultivos con macrófagos. Las cepas *L. gasseri* (70a y 70c) y *L. plantarum* (73a y 73b), que indujeron la mayor liberación de IL-10 en los co-cultivos, fueron empleadas en los ensayos *in vivo* con ratones. *L. plantarum* 73a fue capaz de proteger contra una infección por *Salmonella* en un modelo murino, y sugirió que la activación del sistema inmune del intestino delgado podría estar implicada en la mayor

sobrevida observada en los animales infectados. Además, la mayoría de las cepas, excepto *L. gallinarum*, exhibieron una supervivencia adecuada frente al proceso de liofilización y al almacenamiento a largo plazo a 5 °C. Los protectores lactosa y polidextrosa fueron satisfactorios durante los procesos de liofilización y almacenamiento de dichas cepas.

Finalmente, en el último capítulo de esta tesis, se analizó la funcionalidad de las cepas *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, derivadas de leche materna, en la microbiota fecal de un niño obeso empleando el *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem* (SHIME®). La obesidad infantil es uno de los mayores desafíos que enfrenta la salud mundial, favorecida por la falta de actividad física y una dieta rica en azúcares y grasas. Asimismo, se conoce que la microbiota intestinal contribuye en gran medida en el balance energético. La evidencia actual sugiere que la intervención temprana, en la infancia, reduciría el riesgo de sufrir obesidad en la adultez y comorbilidades severas asociadas como el síndrome metabólico, la diabetes de tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. En este sentido, se planteó que la suplementación con *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 podría ayudar a mitigar la obesidad, modulando la microbiota intestinal en un modelo de obesidad. Cuando la microbiota fecal fue tratada con ambas cepas, se incrementó la diversidad alfa, índice generalmente asociado a una microbiota “saludable”. El filo Proteobacteria, asociado a condiciones inflamatorias, disminuyó significativamente con ambas cepas. Además, los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Clostridium_sensu_stricto_1* disminuyeron significativamente con la administración de ambas cepas. Metabolitos como los iones amonio, predominantes en dietas ricas en proteínas, disminuyeron con la administración de *L. plantarum* 73a. Por otro lado, *L. plantarum* 73a solo o en combinación con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 demostró ser capaz de sobrevivir a las condiciones intestinales del SHIME®. *L. plantarum* 73a, a su vez, fue capaz de persistir una semana más, después del período de *wash-out*. Según los resultados obtenidos hasta el momento, *L. plantarum* 73a solo o combinado con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 podría ser potencial candidato en estrategias complementarias para prevenir la obesidad infantil.

En síntesis, en este trabajo de tesis doctoral se lograron aislar y caracterizar cepas de lactobacilos de leche materna, siendo una de las cepas caracterizadas en este trabajo objeto de un Acuerdo de Transferencia de Material Biológica con el grupo francés Pileje (Expediente UNL REC-1029333-20) para continuar los estudios de caracterización probiótica de *L. plantarum* 73a, con vistas a un potencial licenciamiento de la cepa para su aplicación y explotación comercial como probiótico.

Abstract:

Breast milk is the gold standard for feeding infants, from birth until at least the infant is two years old, according to the World Health Organization. Through breastfeeding, mothers provide their children with essential nutrients, immune cells, and bioactive compounds including a unique, individualized, and dynamic microbiota. Breast milk microbiota favors the normal development of the immune system preventing respiratory and intestinal infections and non-communicable diseases. Preterm infants, less than 37 weeks-old of pregnancy, are the most compromised ones, in terms of health, since their immune system is immature. Globally, prematurity is the leading cause of death in children under the age of 5 years. Preterm infants are at the highest risk of suffering sepsis and necrotizing enterocolitis during hospitalization, and they may develop problems in their growth and neurodevelopment during their childhood. Multiple factors characterize preterm infants, as a lower diversity of the gut microbiota and higher levels of potential pathogens in the gut were found when comparing with full-term infants. Numerous microorganisms are transferred from mothers to infants by lactation. When pairs of mother-infant were analyzed, breast milk bacteria were identified in the infant's feces. Recent studies showed that breast milk between full-term and preterm infants are not only their nutritional composition, but also their microbiota. In addition, breast milk seems to be modulated by the mother's genetic, diet, and environment.

Due to the geographic characteristics of the microbiota, it is interesting to study breast milk microbiota in Argentina and its differences between full-term and preterm infants. In the first chapter of this doctoral thesis, we analyzed breast milk microbiota from full-term and preterm infants by 16s rRNA gene sequencing. From the preterm group, two samples were collected, one of them on the first day post-partum and another when infants reached 37 weeks of gestation or more. The alpha diversity of the full-term group was significantly higher than the first sample of the preterm group. Although, no differences were observed between samples of breast milk from the full-term group and the second sample of the preterm group. When the taxonomic composition of Firmicutes was compared among groups, the breast milk microbiota of the preterm group, across

days postpartum, resembled that of the full-term group. No differences were observed for Proteobacteria and Actinobacteria phylum. The most abundant genera were *Staphylococcus* and *Streptococcus* (from the Firmicutes phylum), and they were also responsible for most of the differences observed. The rate of *Streptococcus/Staphylococcus* was higher in the full-term group than in the preterm group. Significantly lower levels of *Rothia* were observed in preterm infants than in full-term babies. A higher risk of suffering asthma in adulthood was associated with a lower abundance of *Rothia* in children's gut microbiota.

Considering breast milk as a well-known source of beneficial bacteria, in the second chapter of this thesis, we sampled breast milk in order to isolate and identify bacteria of potential interest. Lactobacilli and bifidobacteria, with GRAS status, were isolated and identified. In agreement with the results obtained in the first chapter, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were not predominant genera in the samples analyzed. Fourteen lactobacilli and one bifidobacteria were isolated from 164 breast milk samples in MRS agar. To screen potential probiotics and to use them in different matrix products, it is necessary to consider their functionality and technological capacities. Firstly, strains with the highest anti-inflammatory capacity were selected in a co-culture assay using murine macrophages. *L. gasseri* (70a and 70c) and *L. plantarum* (73a and 73b) demonstrated the highest IL-10 induction capacity and were selected for further testing in *in vivo* mice trial. *L. plantarum* 73a was able to protect against *Salmonella* infection in a murine model. The activation of the intestinal immune system seemed to favor mice survival to infection. Indeed, most of the strains assayed, except for *L. gallinarum*, exhibited an adequate survival to freeze-drying and long-term storage at 5 °C. Lactose and polydextrose were satisfactory protectants for the technological application of these strains as dehydrated cultures.

Finally, in the last chapter of this thesis, *L. plantarum* 73a and *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, both isolated from breast milk, were used to analyze their impact on the fecal microbiota of an obese child using the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME ®). Childhood obesity is one of the biggest challenges of global health, due to limited physical exercise, and a diet rich in sugars and fats. Besides, it was

reported that the intestinal microbiota may contribute significantly to the energy balance. The current evidence suggests that early interventions during childhood could reduce the risk of suffering obesity in adulthood and some comorbidities associated with obesity such as metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases. In this sense, the supplementation with *L. plantarum* 73a and *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 could contribute to obesity management by the modulation of the intestinal microbiota. When these strains were administrated together, the alpha diversity increased in the SHIME®. The increase of this index is considered an indicator of a healthy microbiota. The phylum Proteobacteria, associated with inflammatory conditions, significantly diminished when both strains were administered. *Escherichia*, *Shigella* and *Clostridium_sensu_stricto_1* level also decreased when both strains were administered. Metabolites such as ammonium ion, which is abundant in protein-rich diets, decreased with the administration of *L. plantarum* 73a. On the other hand, *L. plantarum* 73a alone or in combination with *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 was able to survive the intestinal conditions of the SHIME®. In particular, *L. plantarum* 73a was able to persist for a week after the washout period. Considering the results obtained so far, *L. plantarum* 73a alone or in combination with *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 could be potential candidates for complementary strategies for the management of childhood obesity.

In brief, in this doctoral thesis work, it was possible to isolate and characterize strains of lactobacilli from breast-milk, being *L. plantarum* 73a, one of the strains characterized in this work, object of a Material Transfer Agreement with the French group Pileje, in order to continue the studies of probiotic characterization, envisioning a potential licensing for its application and commercial exploitation as a probiotic.

Introducción general

1. LACTANCIA Y LECHE MATERNA

La leche materna es el mejor alimento para los recién nacidos desde las primeras horas de vida, y se recomienda su ingesta exclusiva durante los primeros seis meses de vida y su sostenimiento en lo posible hasta los dos años [1]. La leche materna es un alimento seguro y completo gracias a sus múltiples y diversos componentes que favorecen el normal desarrollo del niño, además de adaptarse a las necesidades del mismo en cada etapa de su crecimiento. Los niños y adolescentes alimentados con leche materna son menos propensos a padecer alergias, sobrepeso u obesidad, entre otras enfermedades crónicas no transmisibles [2], además de tener menos recurrencia de infecciones intestinales y respiratorias. La lactancia exclusiva y su duración han sido asociadas positivamente con un mejor desarrollo cognitivo y asistencia escolar, como así también con mejores ingresos económicos en su adultez. La promoción de la lactancia no solo favorece al normal desarrollo del niño, sino que reduce los costos en Salud Pública y a las propias familias [3].

1.1. Composición de la leche materna

La leche materna es un alimento completo capaz de cubrir todas las necesidades del recién nacido hasta los seis meses de vida, que es cuando el bebé comienza a incorporar gradualmente alimentos sólidos hasta reemplazar por completo la leche materna, en la mayoría de los casos a los dos años de vida. Para cumplir con esta finalidad, contiene macronutrientes como carbohidratos, proteínas, aminoácidos, lípidos y micronutrientes, así como numerosos componentes bioactivos y otros elementos (factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, quemoquinas, compuestos antimicrobianos, etc.) [4]. La composición de la leche materna es dinámica para adaptarse a las necesidades del bebé, observándose cambios en cada etapa de la lactancia, durante el día y mientras succiona el bebé, al igual que con la edad y la alimentación de las madres, entre otros factores. Por ejemplo, el calostro producido en los primeros días tras el parto, es rico en componentes inmunológicos (IgA-S, IgM, etc.) [5] y factores de crecimiento, pero con bajo contenido graso en comparación con la leche madura (a partir de las cuatro a seis semanas siguientes al parto).

En particular, los oligosacáridos de leche materna (HMOs, siglas en inglés de *Human Milk Oligosaccharides*) juegan un rol único porque, a pesar de ser resistentes a la digestión intestinal, pueden ser utilizados por la microbiota intestinal del infante como una fuente de carbohidratos, además de ser absorbidos en plasma y modular funciones sistémicas [6]. Las bifidobacterias presentes en la leche materna y en el tracto gastrointestinal son las principales responsables de la degradación de los HMOs, y actúan en una cadena trófica con otros microorganismos, capaces de utilizar los metabolitos producidos por ésta [7].

1.2. La microbiota de la leche materna

La leche materna no es solo una fuente de nutrientes, componentes inmunológicos y bioactivos, sino también una fuente de microorganismos seleccionados durante la evolución del ser humano para mejorar la metabolización y absorción de nutrientes, además de favorecer el normal desarrollo del sistema inmune y de la barrera intestinal, e intervenir en el eje intestino-cerebro del infante [8]. La leche materna puede contener niveles entre 10^3 a 10^4 UFC mL⁻¹ de microorganismos cultivables [9], pero hasta 10^8 UFC mL⁻¹ de microorganismos no cultivables por los métodos tradicionales de recuento en medios agarizados [10]. Las bacterias presentes en la leche materna tienen un impacto directo en el recién nacido principalmente en la colonización temprana del tracto gastrointestinal [11]. Por otro lado, varios estudios han reportado diferencias en la microbiota intestinal de los niños que recibieron leche materna en comparación a los alimentados con fórmulas infantiles [12–14], sugiriendo que la leche materna impactaría directamente en la microbiota intestinal del recién nacido, a través de su composición química y de los microorganismos presentes.

El origen de la microbiota de leche materna humana no se conoce con certeza, pero se han propuesto dos hipótesis posibles (Fig. 1) [15]. La más antigua plantea que la microbiota podría ser consecuencia del amamantamiento debido al contacto de la piel de la madre y la cavidad oral del infante mediante una retroalimentación [16], basados en la presencia de *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*, encontrados también en la piel de los adultos [8]. Sin embargo, ciertos géneros estrictamente anaeróbicos como *Bifidobacterium*, *Clostridium* o *Bacteroides*, presentes en la leche

materna, no pueden ser explicados por esta hipótesis. Además, se han aislado de leche materna especies de lactobacilos y enterococos genotípicamente diferentes a los encontrados en la piel de la misma madre [17]. Teniendo en cuenta esto, se propone actualmente la vía entero-mamaria, donde los microorganismos serían transportados desde el intestino de la madre hacia la glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia. La evidencia actual sugiere que las bacterias son captadas desde la luz del intestino materno por células dendríticas y luego, conducidas a la glándula mamaria a través de la vía linfática y la circulación sanguínea [16]. Asimismo, los cambios fisiológicos y hormonales implicados durante el embarazo y la lactancia parecerían favorecer el transporte de bacterias desde el intestino a las glándulas mamarias mediante la modulación de la respuesta inmune y aumento de la permeabilidad intestinal [18].

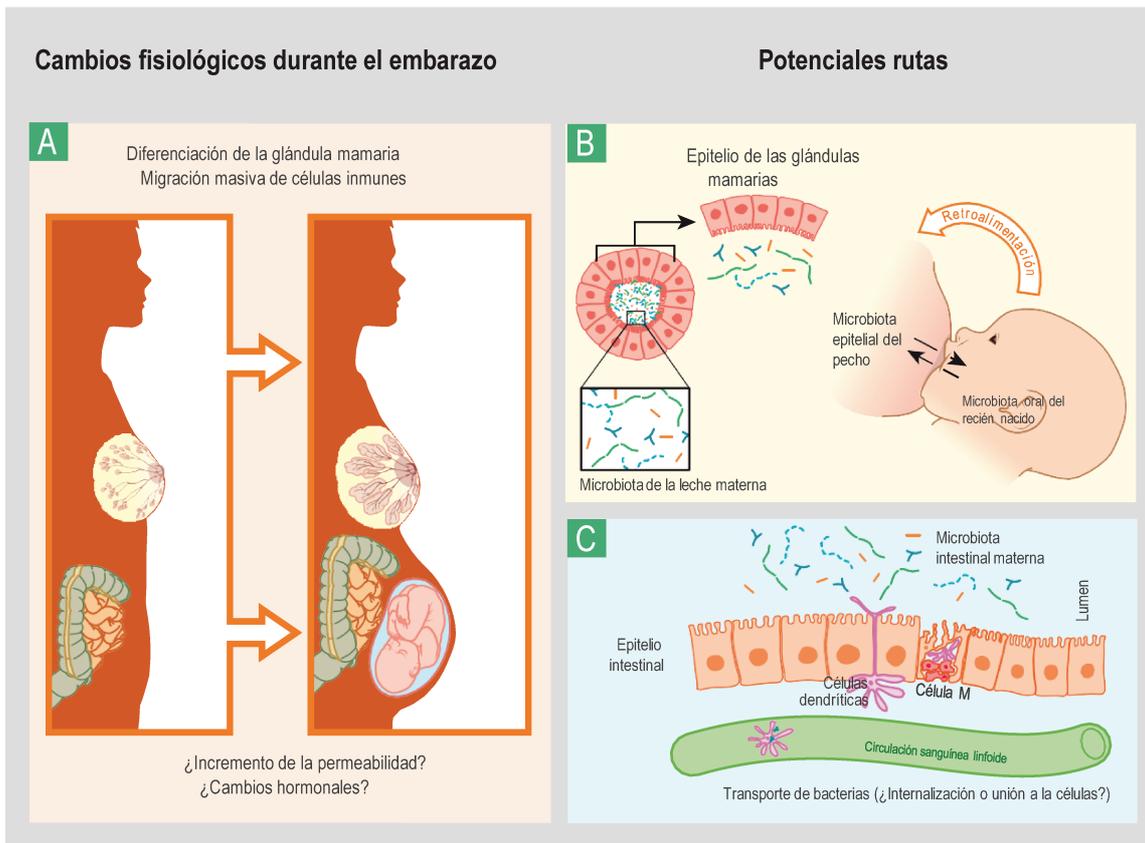


Figura 1. Posibles orígenes de la microbiota de la leche materna: **a.** cambios hormonales durante la gestación podrían aumentar la permeabilidad intestinal, facilitando la migración de bacterias desde el intestino a las glándulas mamarias, **b.** retroalimentación entre las bacterias de la piel de la madre y la cavidad oral del recién nacido, y **c.** bacterias de la microbiota intestinal de la madre podría migrar a la glándula mamaria vía diferentes células inmunes (Figura modificada de Jeurink y col., 2013).

Los primeros reportes sobre la microbiota de leche materna datan desde 1900, aproximadamente, hasta la actualidad [19–22]. Inicialmente, como mencionamos en el párrafo anterior, la presencia de bacterias fue asociado a falta de esterilidad en la recolección de la leche materna y al contacto directo de la piel de las madres, ya que las técnicas disponibles hasta el momento solo permitían detectar bacterias cultivables como *Streptococcus* y *Staphylococcus*, generalmente presentes en la piel [19]. Con el uso de técnicas moleculares modernas, Martín y col. (2003) fueron unos de los primeros en considerar a la leche materna como una fuente de microorganismos benéficos. En los

años siguientes, se aislaron y detectaron numerosas especies, algunas consideradas beneficiosas para la salud, tales como lactobacilos y bifidobacterias [17,23–27]. Más recientemente, gracias a la secuenciación masiva del gen 16S ARNr, la mayoría de los estudios identificaron a los filos Firmicutes y Proteobacteria como los predominantes en leche materna, mientras que Actinobacteria y Bacteroidetes estarían en menor abundancia relativa [28–37]. A pesar de que han sido identificados más de 590 géneros en la leche materna, entre siete y nueve géneros [11] son los que se encuentran en mayor frecuencia y abundancia en cada madre, incluyendo *Streptococcus* y *Staphylococcus* como los géneros preponderantes, seguidos por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* y algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae [8]. Además, otros microorganismos como hongos, arqueas, virus y protozoos han sido identificados mediante secuenciación masiva del gen 16S ARNr [38].

La leche materna es un fluido aún más complejo y diverso que lo que se consideraba tradicionalmente [18]. En este sentido, múltiples factores han sido evaluados en relación con la diversidad y composición de la leche materna (Fig. 2). La ecología describe la diversidad como la variedad y abundancia de las especies en una unidad de estudio. Esta definición aplicada a la ecología microbiana permite determinar cambios en la microbiota de distintos nichos ecológicos, en este caso, la microbiota de la leche materna [39]. La diversidad alfa tiene en cuenta la riqueza y la distribución homogénea de las especies, y los índices más utilizados para medirla son los índices Shannon y Simpson. Por otro lado, la riqueza se define como el número total de especies diferentes o unidades operacionales taxonómicas (*OTUs*, siglas en inglés de *Operational Taxonomic Units*) en una muestra, siendo utilizado generalmente el índice de Chao1 para caracterizarla [40,41]. En general, se ha reportado una diversidad alfa mayor en mujeres que han tenido parto natural o vaginal, en comparación con partos por cesárea [30, 42–44]. Por el contrario, el uso de antibióticos y quimioterapia disminuyen la diversidad microbiana en la leche materna [45,46].

El estado de salud de las madres es otro factor que parece modificar la composición y diversidad de la microbiota, ya que la misma resultó diferente cuando se compararon madres sanas con aquellas que padecían obesidad [47], celiaquía [48] o

SIDA (Síndrome de InmunoDeficiencia Adquirida) [49]. Por ejemplo, un índice de masa corporal (IMC) elevado en madres fue asociado con una abundancia relativa mayor de *Granulicatella* y *Staphylococcus*, y una abundancia relativa menor de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* en leche materna madura [11]. Recientemente, en un estudio realizado en 393 participantes se observaron cambios en la microbiota según se amamantaba o se realizaba la extracción de leche materna en forma indirecta (mediante sacaleches), relacionando este último método de alimentación indirecto con un enriquecimiento en patógenos potenciales y una disminución de los niveles de bifidobacterias [42]. Por otro lado, la concentración de ácidos grasos monoinsaturados fue asociada negativamente con la abundancia relativa de Proteobacterias, pero correlacionada positivamente con la abundancia relativa de *Lactobacillus* en un estudio con 80 participantes [44]. Asimismo, otro trabajo demostró que la leche de madres con mastitis presentó una diversidad alfa menor en comparación con las madres saludables. *S. aureus* parece predominar en la leche materna durante la fase aguda de la mastitis, mientras que *S. epidermidis* lo hace en la fase subaguda de la enfermedad [11]. En resumen, los trabajos realizados hasta el momento refuerzan la complejidad de la leche materna, y su interrelación directa e indirecta con el par madre e hijo, que deberán considerarse en un futuro para el mejor entendimiento de la leche materna y sus implicancias en la salud.

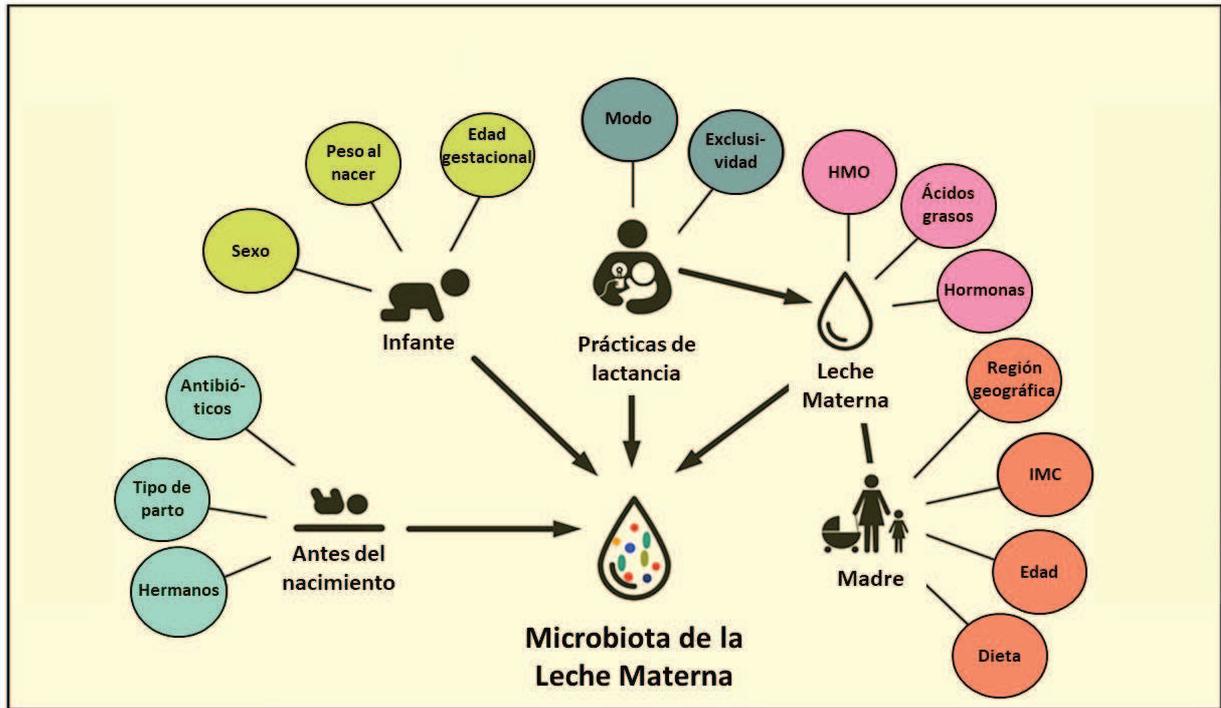


Figura 2. Factores que podrían afectar la composición de la microbiota de la leche materna (Figura modificada de Moosavi y col., 2020).

2. MICROBIOTA INTESTINAL

La microbiota intestinal del ser humano es una comunidad microbiana compleja dominada por bacterias, pero que también incluye arqueas, hongos y virus [51]. El establecimiento de la microbiota intestinal ocurre inmediatamente después del nacimiento, donde el intestino del recién nacido es colonizado por microorganismos [52]. No obstante, algunas investigaciones sugieren que podría comenzar incluso antes del nacimiento ya que el medio uterino no sería totalmente estéril [53,54]. Durante los primeros años de la infancia, la microbiota es moldeada por la leche materna y más tarde, por la introducción de alimentos sólidos, hasta estabilizarse hacia los dos a tres primeros años de vida, con una composición que se asemeja a la del adulto [55]. El desarrollo de la microbiota intestinal es regulado por complejas interacciones entre el huésped y factores ambientales, incluyendo la alimentación y el estilo de vida. La microbiota intestinal tiene un rol crucial no solo en la metabolización de nutrientes, sino también en la correcta maduración del sistema inmunológico allí presente y del eje intestino-cerebro [56]. En este sentido, el establecimiento de una microbiota intestinal diversa y abundante en los primeros años de vida es fundamental para alcanzar y mantener la salud en los años posteriores.

2.1. Establecimiento y composición de la microbiota intestinal

Durante las primeras horas posteriores al parto, la microbiota intestinal del recién nacido se caracteriza por una complejidad baja e incluso está dominada por un solo filo con limitadas especies (3 a 7) [57]. Aunque inicialmente la microbiota del infante es similar en distintas partes del cuerpo (intestino, piel, cavidad oral y nasal, etc.), a partir de la sexta semana de vida se establecen grupos específicos de microorganismos en cada hábitat del cuerpo humano. Los géneros que colonizan y predominan en todo el cuerpo del recién nacido son *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Prevotella*. Sin embargo, anaerobios facultativos como *Escherichia* y *Klebsiella* solo se encuentran en el intestino (Fig. 3). Estos últimos parecieran estar implicados en la reducción del potencial redox para la formación de un ambiente estrictamente anaerobio en el intestino del bebé [58].

Luego, con la incorporación de la leche materna y la generación de condiciones anaerobias, los colonizadores iniciales como enterobacterias, *Escherichia/Shigella*, disminuyen gradualmente y comienza a incrementarse la proporción de bacterias anaeróbicas estrictas, principalmente de los géneros *Bifidobacterium* y *Bacteroides* [59]. En particular, en esta etapa, las bifidobacterias representan en promedio el 37 % de toda la microbiota intestinal del recién nacido [60]. Asimismo, las especies provenientes de la microbiota vaginal de la madre, presentes en los primeros días, no se detectan más a la semana de vida [61]. De esta manera, a partir del primer mes hasta los seis meses de vida, el filo Actinobacteria es dominante y probablemente sea favorecido por los HMOs de la leche materna, que son principalmente metabolizados por bifidobacterias [56].

A partir de los seis meses de vida, con la reducción gradual de la lactancia y la introducción e incremento de alimentos sólidos, los niveles de bifidobacterias disminuyen progresivamente. *Clostridium* y *Enterobacter* disminuyen también en forma gradual. Por el contrario, comienzan a incrementarse especies del género *Bacteroides*. Otras familias como Lachnospiraceae y Ruminococcaceae, poco abundantes a los dos meses de vida, se incrementan hasta estabilizarse constituyendo entre el 12 y el 20% de la comunidad bacteriana. Al mismo tiempo, aumentan los géneros *Akkermansia* y *Faecalibacterium* [62]. La mayoría de estos géneros y familias son capaces de degradar fibras alimentarias complejas, y producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC) a partir de los alimentos sólidos incorporados. En conclusión, la incorporación de alimentos sólidos se asocia con un incremento de carga bacteriana y una mayor diversidad, con un aumento de los niveles de AGCC y una dominancia de los filos Bacteroidetes y Firmicutes [56,61].

En general, aproximadamente desde el segundo hasta al cuarto año de vida, la composición de la microbiota del niño cambia paulatinamente hasta asemejarse a la de un adulto, dominada por miembros del filo Firmicutes y Bacteroidetes. Aunque el proceso es único y específico de cada individuo, se sugiere que factores perinatales como el modo de parto, el patrón alimentario para bebés a término, la edad gestacional para los bebés prematuros, y la administración de antibióticos, entre otros factores, podrían influir en este proceso [61]. De allí, que se considere los primeros años vida como una

“ventana de oportunidades” para la intervención y prevención de enfermedades de la adultez, y algunas de las estrategias propuestas consideran el uso de bióticos tales como probióticos, prebióticos, simbióticos [63] y más recientemente, postbióticos [64].

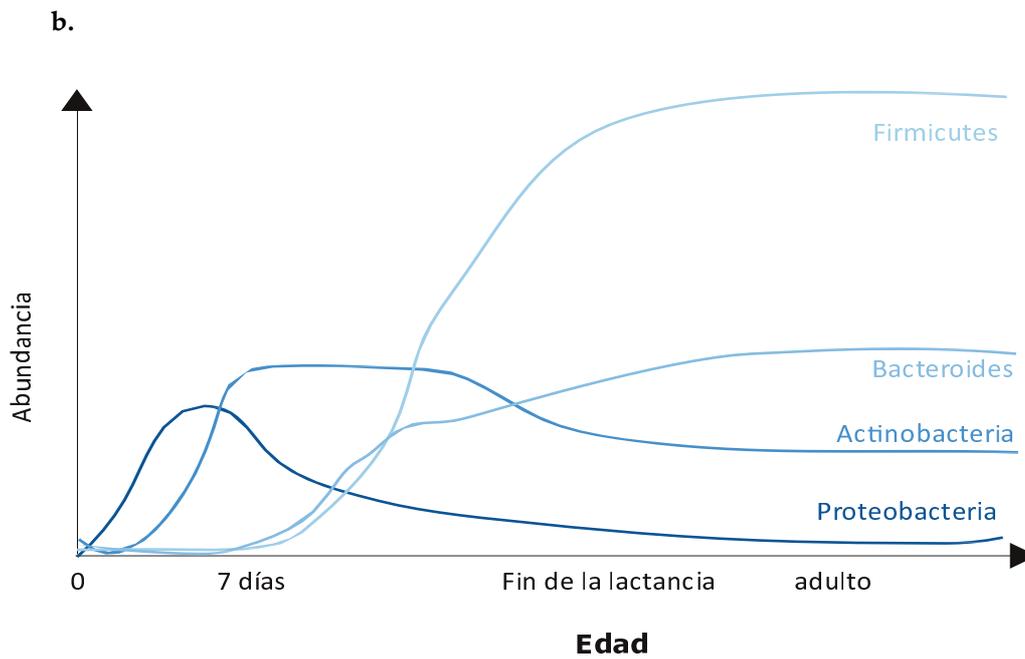
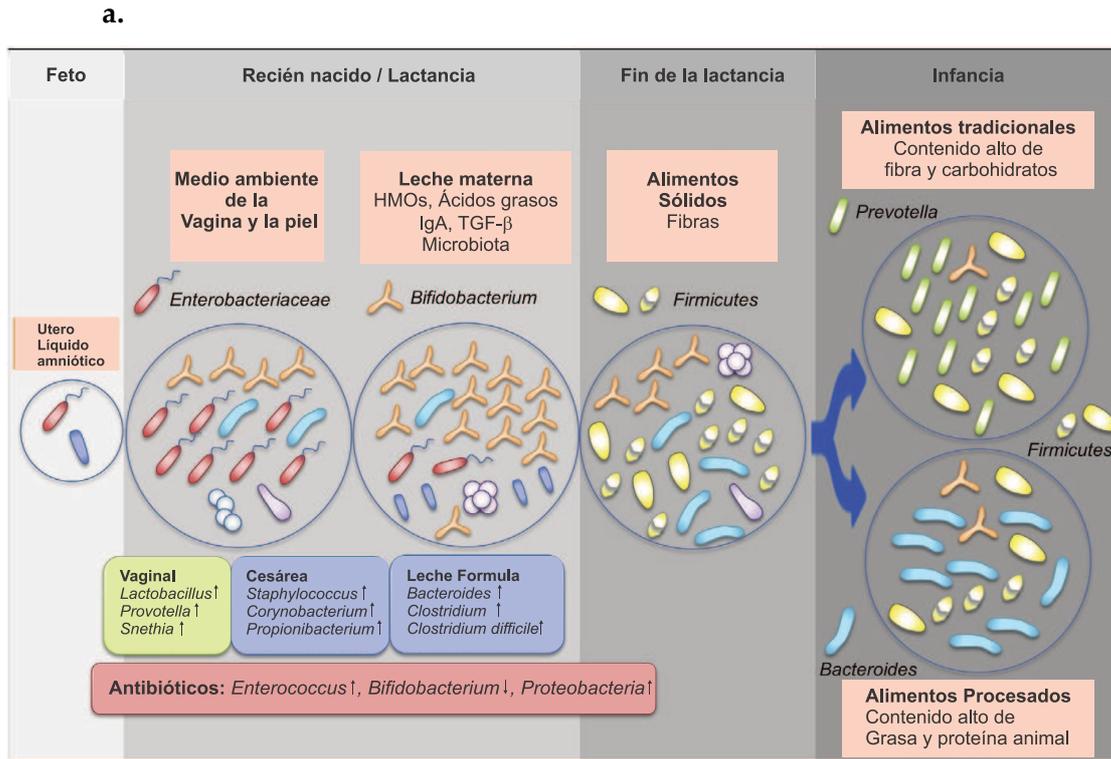


Figura 3. a. Establecimiento de la microbiota intestinal y algunos factores que la modifican desde el útero hasta su adultez. La diversidad microbiana se incrementa con la edad hasta estabilizarse en la adultez. Los principales factores que afectan este proceso son el modo de parto, la lactancia materna exclusiva, mixta o exclusiva con fórmulas infantiles, la introducción de alimentos sólidos y los alimentos consumidos en la infancia (Figura modificada de Tanaka y

Nakayama, 2017). **b.** Composición bacteriana intestinal a nivel filo a lo largo del crecimiento (Figura modificada de Haller y col., 2018).

3. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

En el año 2013, un panel de expertos fue convocado por la *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) para discutir diversos aspectos del campo de los microorganismos probióticos. Durante la reunión, la definición de probióticos previamente establecida por Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura fue ratificada, y se establecieron pautas de alcances y limitaciones en relación con el término probiótico.

Los probióticos se definen como *microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio sobre la salud del huésped* [67]. Recientemente, se revisaron los criterios que debe cumplir un microorganismo para clasificarse como probiótico: identidad, seguridad, estar viables al momento de ser administrados y poseer al menos un estudio clínico de eficacia que demuestre sus efectos benéficos [68]. Los probióticos pueden vehiculizarse como suplementos, alimentos de consumo general, alimentos de uso médico, o fórmulas infantiles, entre otros. Excluidos por definición quedaron los alimentos fermentados (como el kéfir o la kombucha) sin un consorcio microbiano definido, el consorcio microbiano utilizado para los trasplantes de microbiota fecal, como así también subproductos o metabolitos de la fermentación y células no viables [67].

3.1. Probióticos: especies y potenciales beneficios

Los probióticos más ampliamente utilizados en alimentos incluyen cepas de lactobacilos y bifidobacterias [69], entre ellas, *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve* y *longum*) y *Lactobacillus* (*acidophilus*, *gasseri* y *johnsonii*). En suplementos alimenticios se utilizan, además, ciertas especies de levaduras del género *Saccharomyces* o bacterias esporuladas del género *Bacillus*. Otras especies como *Akkermansia muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii*, recientemente estudiadas por sus beneficios para la salud,

podrían ser utilizadas como probióticos “de la nueva generación” [67]. Actualmente, por ejemplo, una empresa de California (EEUU) desarrolló un producto innovador, Pendulum Glucose Control [70], compuesto por una cepa de *A. muciniphila* y destinado al tratamiento de la diabetes tipo 2 [71].

El género *Lactobacillus* es reconocido no solo como probiótico, sino también porque se encuentra en forma ubicua en alimentos fermentados, plantas, invertebrados y vertebrados, considerando este último al ser humano [72]. Pero es debido a su utilización en la producción de alimentos fermentados que se incluye en un grupo de bacterias genéticamente diversas denominadas bacterias ácido lácticas (BAL). Algunas características de las BAL es que son bacterias Gram positivas, no esporuladas, no móviles y catalasa-negativas. Dentro de las BAL, los lactobacilos son los miembros más resistentes a la acidez, encontrándose su pH de crecimiento inicial óptimo entre 5,5 a 6,2 [73]. Los lactobacilos pertenecen al filo Firmicutes y son capaces de crecer anaeróbicamente, pero son aerotolerantes y fermentan obligadamente azúcares, siendo el ácido láctico el principal producto final de su metabolismo. Dentro del género se observan especies tanto mesófilas como termófilas, homofermentantes como heterofermentantes. Su aplicación como probióticos es debido en gran medida a que son bacterias generalmente reconocidas por su estatus de *Generally Recognized As Safe* (GRAS) [74]. El género *Lactobacillus*, propuesto en 1901 por Beijerinck, y compuesto hasta 2020 por 261 especies, ha sido reclasificado en 25 nuevos géneros considerando diversos criterios taxonómicos: *Lactobacillus delbrueckii*, *Paralactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* y *Lentilactobacillus* [75]. Numerosas especies tradicionales usadas como probióticos cambiaron de nombre: por ejemplo, *Lactobacillus rhamnosus* pasó a denominarse *Lacticaseibacillus rhamnosus*. En este trabajo, con el objetivo de facilitar entendimiento, al mencionar el género *Lactobacillus* se hará referencia tanto al género *Lactobacillus* propiamente dicho como a los nuevos géneros reclasificados de la denominación anterior. Asimismo, como consecuencia de la diversidad genética de estos

miembros, su aplicación incluye alimentos fermentados, la biotecnología y la salud tanto humana como animal, por lo tanto, este grupo de bacterias ha sido vinculado siempre al desarrollo económico [72].

Por otro lado, el Dr. Tissier fue el primero en describir a las bifidobacterias en 1900, para aquel entonces el nombre propuesto para estos microorganismos, aislados a partir de las heces de un niño lactante, fue *Bacillus bifidus communis* [76]. Aunque en un principio las bifidobacterias fueron incluidas dentro de la familia Lactobacillaceae, debido a que comparten con los lactobacilos la producción de ácido láctico a partir del metabolismo de los azúcares, ya para el año 1974 fueron catalogadas dentro del filo Actinobacteria y clasificadas en el género *Bifidobacterium* [77]. Algunos de los motivos de esta discriminación fue el contenido de G + C en su genoma y la presencia de una vía exclusiva de degradación de hexosas conocida como la “vía de la fructosa-6-fosfato fosfocetolasa” [78]. El género *Bifidobacterium* está constituido por bacterias Gram positivas, no esporuladas, no móviles y catalasa-negativas, con agrupaciones irregulares en forma de Y o V, que integran la familia Actinomycetaceae. Siendo el ácido acético y el ácido láctico los principales productos de la fermentación de glucosa [77]. Son generalmente consideradas como anaerobios estrictos, aunque algunas cepas pueden tolerar el oxígeno y son ácido-tolerantes, con un pH óptimo de crecimiento entre 6,5 a 7,0 [79]. Al igual que el género *Lactobacillus*, el género *Bifidobacterium* es generalmente considerado GRAS, a excepción de la especie *Bifidobacterium dentium* que se encuentra asociada al desarrollo de caries, aunque su potencial patogénico es bajo en comparación con otros patógenos [77]. Algunas de las fuentes más comunes donde se aislaron bifidobacterias son derivadas del tracto gastrointestinal del ser humano y otros animales, o por contaminación indirecta con estas últimas [80].

Lactobacillus y *Bifidobacterium* son dos géneros que son ampliamente utilizados como probióticos, ya que mediante diversos mecanismos como la exclusión competitiva, la producción de metabolitos o enzimas inhibitorias, además de efectos relacionados a la estimulación del sistema inmune [67], pueden producir beneficios al consumidor. Por ejemplo, diversas patologías (inflamación intestinal, intestino irritable, alergias, obesidad, etc.) conllevan un proceso de inflamación exacerbada de la respuesta innata,

adaptiva o ambas. En este sentido, los probióticos se han propuesto como tratamientos alternativos o complementarios para mitigar estos efectos [81]. Durante la respuesta innata, dos receptores parecieran estar implicados en la respuesta inmune asociada a las mucosas, *Toll-like receptor 4* y *Toll-like receptor 2* [82]. El primero, *Toll-like receptor 4*, se expresa en la membrana de los enterocitos y, por lo tanto, está en contacto directo con microorganismos del lumen intestinal. Uno de los ligandos de este receptor son los LPS (lipopolisacáridos) presentes en las bacterias Gram negativas, y cuando se produce esta unión, se activa una cascada de factores transcripcionales que culmina en la expresión de citoquinas inflamatorias (TNF alfa, IL-6 y IL-1 β). El ácido lipoteicoico, componente mayoritario de la pared de las bacterias Gram positivas, tales como lactobacilos y bifidobacterias, actúa como ligando del *Toll-like receptor 2*. Los enterocitos y diversas células inmunológicas expresan el *Toll-like receptor 2*, y algunos ensayos sugieren que la unión con distintos probióticos podría actuar inhibiendo citoquinas inflamatorias [83] y favoreciendo la tolerancia de células inmunológicas [84]. Aunque los mecanismos implicados podrían ser aún más complejos que los anteriormente mencionados, por ejemplo, se ha reportado que cuatro cepas de lactobacilos indujeron la expresión de citoquinas inflamatorias y la activación de la vía del *Toll-like receptor 2*, y estos cambios, incrementaron la fagocitosis y la actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *S. Typhimurium* [85]. A su vez, los cambios desencadenados en la respuesta innata por los probióticos podrían producirse en conjunto con la respuesta adaptiva. Por ejemplo, la activación de citoquinas inflamatorias podría estimular la producción de células *Natural Killer* y células Th1, y con ello la inmunidad frente a patógenos, mientras que la homeostasis y tolerancia podrían favorecerse mediante la producción de IL-10 y células T regulatorias [82]. Además, varios estudios en modelos animales sugieren que cepas probióticas podrían atenuar la permeabilidad intestinal observada en enterocolitis necrotizante [86], tratamientos con antibióticos [87] y dietas ricas en grasas [88], entre otros. De este modo, la administración de probióticos podría ser beneficiosa de forma preventiva o terapéutica, en algunas enfermedades tales como el síndrome del intestino irritable, enfermedad intestinal inflamatoria, enterocolitis necrotizante, diarrea causada por infecciones o antibióticos [89].

3.2. La leche materna como fuente potencial de probióticos

El tracto gastrointestinal y la leche materna son una fuente conocida de potenciales probióticos. Una de las primeras evidencias de la presencia de bacterias en la leche materna fue el aislamiento de una cepa de *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* (denominación anterior *Lactobacillus plantarum*, Zheng y col. 2020) en 1979 [19]. Posteriormente, Martín y col. (2003) aislaron cepas de *Lactobacillus gasseri* y *Limosilactobacillus fermentum* (denominación anterior *Lactobacillus fermentum*, Zheng y col. 2020) de leche materna. A partir de allí, se incrementó el número de publicaciones que estudiaban el potencial uso como probiótico de cepas aisladas de este fluido vital, caracterizando su capacidad antimicrobiana [23], la modulación del sistema inmunológico [26], la seguridad [90], o la potencial de aplicación en alimentos [91]. En particular, se conoce que las bacterias presentes en la leche materna reducen la incidencia y severidad de infecciones en el recién nacido. Los niños alimentados con leche materna son menos susceptibles a padecer infecciones respiratorias y gastrointestinales, alergias y enfermedades crónicas comparado con los niños que no recibieron este alimento [61]. Los mecanismos de acción son variados, desde la producción de péptidos y/o ácidos antibacterianos, competencia y/o exclusión y regulación de la respuesta inmune. Por ejemplo, lactobacilos aislados de la leche materna inhiben la adhesión de patógenos gastrointestinales como *E. coli*, *Shigella* spp., *Pseudomonas* spp. y *Salmonella* spp. [23,92,93]. Además, los niños alimentados con leche materna, en comparación con los alimentados con fórmulas infantiles, presentan una mejor respuesta Th1 [94]. En este sentido, se conoce que cepas de lactobacilos aisladas de leche materna favorecen la expresión de citoquinas como IL-2, IL-12 y TNF alfa, vinculadas a la respuesta Th1 [26]. Un estudio demostró que cepas de *L. fermentum* y *Ligilactobacillus salivarius* (denominación anterior *Lactobacillus salivarius*, Zheng y col. 2020) fueron potentes activadores de células *Natural Killer* de la inmunidad innata, activadoras moderadas de células CD4⁺ y CD8⁺ y reguladoras de la inmunidad adquirida [8].

3.3. Aspectos tecnológicos y funcionales en la selección de bacterias probióticas

Para seleccionar cepas a ser utilizadas como microorganismos probióticos en alimentos o suplementos, no sólo deben ser consideradas sus propiedades beneficiosas para la salud, sino también ciertos aspectos tecnológicos que hagan posible su uso en la industria. Los criterios de selección deben incluir la capacidad de crecer a alta densidad celular en medios relativamente económicos, de ser cosechadas por centrifugación formando un pellet firme, de ser congeladas o deshidratadas y de retener su viabilidad y propiedades funcionales a lo largo de la conservación del cultivo concentrado y de la vida útil del producto utilizado como vehículo, entre otros. Por ejemplo, Saarela y col. (2006) demostraron una menor viabilidad de bifidobacterias en jugos de frutas de pH bajo que en productos lácteos durante el almacenamiento. En todos los casos, los resultados siempre muestran una fuerte dependencia de la cepa, lo que remarca que no pueden realizarse generalizaciones para catalogar a una especie como más resistente o propicia para su uso en la industria. Además, debe tenerse presente que es deseable que la funcionalidad de una cepa considerada probiótica se evalúe una vez que ésta es incorporada en el producto y no exclusivamente como cultivo puro, para constatar que el procesamiento, las características fisicoquímicas de la matriz y el almacenamiento no hayan afectado sus propiedades benéficas.

Otro punto a considerar es el uso de monocepas o multicepas probióticas, en este sentido, se observaron resultados diversos que parecen ser dependientes, una vez más, de las características particulares de cada cepa [96]. La hipótesis detrás del uso de multicepas implica incrementar los beneficios al consumidor mediante un efecto sinérgico producto de la combinación de varias cepas probióticas. Por ejemplo, Drago y col. (2015) demostraron una mayor expresión de IL-10 *in vitro* en células mononucleares periféricas de personas con asma, cuando se adicionaron *L. salivarius* LS01 y *Bifidobacterium breve* BR03 combinadas, en comparación a las cepas individuales. La administración de un grupo de cepas no siempre asegura un beneficio mayor al consumidor que la administración de cepas individuales. *In vitro*, por ejemplo, combinaciones de bifidobacterias y lactobacilos demostraron tanto capacidad de

tolerarse como inhibir su crecimiento entre sí, siendo siempre dependiente de la combinación de cepas considerada [98,99]. Aunque para ciertas patologías como enfermedades intestinales inflamatorias el uso de multicepas parece potenciar los beneficios para el paciente con respecto a la administración de las cepas individuales [100], la complejidad de las interacciones entre especies y sus efectos sobre el huésped requieren un estudio detallado de cada caso particular [96].

Finalmente, cabe destacar que en la actualidad surgieron nuevas tecnologías como la encapsulación en matrices poliméricas sintéticas, semisintéticas o naturales, e incluso el uso de *biofilm* propios de cepas para aumentar la sobrevivencia de los microorganismos por el tracto gastrointestinal [96,101]. Estas nuevas tecnologías más costosas, en comparación con la liofilización y secado *spray*, aplicadas principalmente a las nuevas generaciones de probióticos como *A. muciniphila*, *F. prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotaomicron* particularmente sensibles a los procesos convencionales, permitirían su uso en el tratamiento de enfermedades específicas como la diabetes tipo 2, obesidad y enfermedades del tipo inflamatorias [102,103]. En la actualidad, sin embargo, se conoce que la viabilidad celular no es siempre una condición *sine qua non* para que se observen efectos benéficos sobre la salud [104]. En este sentido, el término postbiótico ha surgido recientemente y hace referencia a los efectos benéficos de microorganismos no viables, sus metabolitos y componentes celulares [105]. En relación a *A. muciniphila*, un estudio en ratones demostró que la pasteurización de la cepa no sólo conservó sus beneficios, sino que aumentó su eficacia frente a la obesidad y diabetes [106]. Esto no se observó cuando la misma cepa fue autoclavada [107], demostrando la importancia del proceso tecnológico empleado en las propiedades benéficas de una cepa.

Objetivo general

Generar conocimiento científico relativo a la presencia de bacterias lácticas (principalmente lactobacilos) en leche materna y estudiar sus propiedades como potenciales probióticos para nuevos alimentos funcionales.

Objetivos específicos:

- Estudiar la microbiota de leche materna de madres de bebés prematuros y a término mediante secuenciación masiva del gen 16S ARNr.
- Aislar e identificar cepas de lactobacilos a partir de muestras de leche materna para formar una colección de cepas de este origen.
- Optimizar la formulación de medios de cultivo de lactobacilos para la producción de biomasa y analizar la respuesta a factores tecnológicos de interés en alimentos, principalmente su aptitud para ser utilizados como cultivos deshidratados.
- Caracterizar la funcionalidad de las cepas a través de estudios *in vitro* e *in vivo*, con particular interés en la capacidad de promover la salud intestinal.
- Determinar la capacidad de resistencia a barreras fisiológicas y estudiar la interacción con el intestino.

Capítulo 1

Microbiota de leche materna en madres de bebés a término versus prematuros

1. Introducción

El desarrollo fisiológico, inmunológico y de la microbiota del bebé se ve influenciado por múltiples factores. Se conoce que los bebés nacidos a término, por parto natural (vaginal) y alimentados con leche materna tienden a establecer una microbiota adecuada y un correcto desarrollo del sistema inmunológico. Esto permite prevenir patologías del tipo inflamatorias y desórdenes inmunológicos durante la infancia y en los años posteriores [52,108]. Los beneficios de la lactancia parecieran ser dependientes de la dosis y de su duración; una lactancia prolongada podría prevenir en mayor grado enfermedades de tipo respiratorias [109]. En particular, los bebés prematuros son los más comprometidos nutricionalmente y, debido a su sistema inmune inmaduro, poseen mayor riesgo de padecer enterocolitis necrotizante y complicaciones posteriores en la infancia [110]. La microbiota gastrointestinal de los niños prematuros se caracteriza por presentar una menor diversidad microbiana y un mayor porcentaje de potenciales patógenos que aquellos niños nacidos a término, siendo aún más desfavorecida la microbiota intestinal por el uso de antibióticos [111].

En la actualidad, el conocimiento sobre la microbiota de la leche materna en madres de bebés prematuros es aún escaso [112]. Unas de las principales razones es la dificultad en la producción de leche materna debido al nacimiento anticipado, el estrés psicosocial, el retraso en la lactogénesis y la separación de las madres de sus niños [113]. Además, las madres de bebés prematuros deben realizarse la extracción de leche de forma manual o mecánica mediante bombas. Por otro lado, se conoce que los macronutrientes presentes en la leche materna de madres que han dado a luz prematuramente difieren de las madres de bebés a término [114], por lo tanto es esperable que su microbiota también se vea afectada.

2. Objetivos

- Estudiar la microbiota de leche materna de madres de bebés a término *versus* la microbiota de leche materna de madres de bebés prematuros, y determinar si existen diferencias al avanzar la edad gestacional del bebé en aquellas madres que dieron a luz de forma anticipada.

3. Materiales y métodos

3.1 Sujetos y muestreo de leche materna

Las muestras de leche materna fueron obtenidas a partir de 24 madres de la ciudad de Santa Fe, Argentina. Las madres fueron agrupadas según la edad gestacional de sus hijos al momento del nacimiento, el grupo a término dio a luz con un mínimo de 37 semanas de gestación y el grupo de prematuros con menos de 37 semanas de gestación. Las muestras de leche materna obtenidas de madres a término entre los días 6 a 12 posparto fueron denominadas T. En las madres del grupo de prematuros, se tomaron dos muestras de leche materna, la primera entre los días 3 y 12 posparto (P) y la segunda muestra en el momento que hubieran alcanzado entre las 37 y 40 semanas de gestación (PT). Las muestras se obtuvieron de madres donantes en el hospital público J. B. Iturraspe y el sanatorio privado San Gerónimo, además de madres voluntarias espontáneas de la ciudad de Santa Fe. A todas las participantes se les brindó información oral y escrita, y además se obtuvo el consentimiento firmado (S1). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética del CCT-CONICET Santa Fe. La historia clínica de las pacientes fue obtenida en cada grupo incluyendo tipo de parto (cesárea o vaginal), edad gestacional, sexo del bebé, uso de antibióticos o corticoides y características de las madres como edad, IMC antes del embarazo, ganancia de peso durante el embarazo, hijos previos al embarazo, tabaquismo durante el embarazo o lactancia o si padeció mastitis u otras complicaciones durante la lactancia (S2). Todas las madres que tuvieron parto por cesárea recibieron antibióticos en forma profiláctica. Antes de realizar la toma de muestra, la superficie del pecho fue higienizada con agua y jabón, y los primeros 500 a 600 μL de leche materna fueron descartados. Luego, las muestras fueron recolectadas en un colector descartable estéril e inmediatamente refrigeradas a 5 °C y procesadas en el laboratorio dentro de las primeras dos horas de su recolección.

3.2 Extracción de ADN y secuenciación de las muestras de leche materna

Para la extracción de ADN a partir de las muestras de leche materna se utilizó el kit “MasterPure™ Complete DNA” (Epicentre, Madison, Wisconsin, EEUU). Las mismas (2 mL) se centrifugaron ($20000 \times g$, 20 min, 4 °C) para remover el contenido graso y luego se lavaron dos veces con 500 μ L de solución salina. Los *pellets* obtenidos fueron utilizados para la extracción de ADN, resuspendiéndolos en solución de lisis con 1 μ L de Mutanolisina (10 U mL^{-1}) y 2 μ L de Lisozima 20 mg mL^{-1} . Para facilitar la lisis celular, se agregaron perlas de vidrio de dos tamaños diferentes (0,1 – 0,4 mm y 0,4 – 0,6 mm, Sigma, EEUU). Las muestras fueron incubadas durante 60 min a 37 °C y luego tratadas en un disruptor celular “Mini-bead-beater 8™” (Biospec, Bartlesville, IL, EEUU) durante 2 ciclos de 1 min, con intervalos de 30 s en baño de hielo. Se adicionó 1 μ L de proteinasa K y se incubó a 65 °C por 20 min; se agregó RNasa A (5 mg mL^{-1}) y se incubó a 37 °C por 60 min. Las muestras fueron mantenidas en hielo, para ser luego tratadas con 175 μ L del reactivo precipitante de proteínas y posteriormente centrifugadas ($25000 \times g$, 10 min, 4 °C). Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos limpios y tratados con 500 μ L isopropanol para la precipitación del ADN ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$, 2 a 8 h). Los *pellets* obtenidos fueron lavados con etanol al 70 %, secados a temperatura ambiente y suspendidos en 31 μ L de agua *milliQ*. El ADN se cuantificó mediante fluorimetría (Qubit 2.0 fluorometer, Life Technology, Carlsbad, California, EEUU) y las librerías se secuenciaron mediante corridas “paired-end” 2x300pb (MiSeq Reagent kit v3) en la plataforma “MiSeq-Illumina” (servicio de secuenciación FISABIO, Valencia, España).

3.3 Análisis bioinformático de los datos de la secuenciación masiva

Las secuencias crudas fueron procesadas utilizando una versión modificada del *pipeline* propuesto por Logares (2017) (<https://github.com/ramalok>). Primero, se utilizó el *software* “SPAdes v3.5.0” [116] para corregir errores de sustitución ocurridos durante la secuenciación; este *software* emplea algoritmos basados en el agrupamiento de HAMMER en base a los valores de calidad de las secuencias e introduce sanciones bayesianas (BAYES HAMMER *tool*) [117]. Luego, se realizó un filtrado de secuencias en base a la calidad de las mismas, usando la función “fastq_filter” del programa

“USEARCH-v10” [118]. Las secuencias que pasaron el control de calidad fueron luego analizadas usando “UNOISE2” [119] con el objetivo de definir las OTUs sin agrupamientos (*zero-radius OTUs* [zOTUs]) [120,121]. Finalmente, las zOTUs definidas fueron asignadas taxonómicamente mediante BLAST [122], usando la base de datos SILVA (SSU Ref 132 NR 99) como referencia y las tablas de zOTU fueron creadas con la función “otutab” en “USEARCH-v10” [123]. Antes de realizar los demás análisis, se restaron las secuencias correspondientes al control de secuenciación (control negativo) a cada una de las secuencias obtenidas de las muestras de leche materna. Para los cálculos de diversidad y riqueza, y análisis posteriores, se consideraron solamente aquellas zOTUs con abundancia mayor o igual a 10 secuencias, para asegurarnos que nuestras conclusiones no estén alteradas por errores de secuenciación. Además, las secuencias asignadas a Archaea y Cloroplasto fueron eliminadas. Para poder realizar la comparación entre las muestras evitando sesgo por esfuerzo de muestreo, se realizó un submuestreo aleatorio en cada una de ellas en base a la muestra de menor número de secuencias.

A continuación, se utilizó el paquete de datos “vegan v.2.5” del *software* R (R team, 2019) para crear las curvas de rarefacción de las zOTU y determinar los índices de diversidad y riqueza (Shannon [124], Simpson [125] y Chao1 [126]) de las muestras de estudio. Además, se realizaron los gráficos NMDS (siglas en inglés de *Non-Metric Multidimensional Scaling*) utilizando el *software* R.

3.4 Análisis estadístico

Se desarrolló un análisis de PERMANOVA (siglas en inglés de *Permutational multivariate analysis of variance*) (9999 permutaciones) en matrices triangulares Bray–Curtis para examinar las diferencias en la composición bacteriana de las zOTUs correspondientes a los tres grupos estudiados. A continuación, un análisis de SIMPER (siglas en inglés de *Similarity PERcentages breakdown*) determinó las OTUs que más contribuyeron a las diferencias observadas entre las muestras.

Se empleó la prueba T de *student* para datos paramétricos o la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos para analizar las diferencias entre los pares de

muestras independientes entre sí (P vs. T y PT vs. T). Las diferencias del par P vs. PT, que pertenecían a las mismas madres en distintos tiempos, fueron analizadas mediante la prueba T para muestras pareadas o la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, según la distribución de los datos. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. La normalidad de las muestras (distribución paramétrica o normal) fue analizada mediante la prueba de normalidad de Ryan-Joiner, a nivel filo, familia, género y especie. Estos análisis se realizaron utilizando el programa PAST (Øyvind Hammer, *Natural History Museum, University of Oslo*) [127].

4. Resultados

Las madres que participaron del estudio se dividieron en dos grupos según la edad gestacional de sus bebés, el grupo a término (≥ 37 semanas de gestación, $N = 12$) y el grupo de prematuros (< 37 semanas de gestación, $N = 12$). Se realizó una toma de muestra para el grupo a término, denominadas Tx (donde x va de 1 a 12). En cambio, se tomaron 2 muestras al grupo prematuros, denominadas muestras P a la primera toma (12 muestras) y muestras PT (12 muestras) a las muestras tomadas en la fecha en que hubieran alcanzado las 37 o más semanas de gestación. Las muestras se enumeraron según la madre donante. Por ejemplo, las muestras P5 y PT5 pertenecen al grupo prematuro y a la misma madre, siendo la muestra Px tomada dentro los primeros 15 días posparto y la muestra PTx cuando el bebé hubiera alcanzado la edad gestacional de 37 o más semanas.

En la Tabla 1 se muestran los datos clínicos del par madre-hijo que participaron del estudio. Como se puede observar, no hubo diferencias significativas entre las fechas en que se realizaron las tomas de muestras y en la edad de las madres entre ambos grupos, pero sí en la edad gestacional y en el peso del bebé al nacer. Asimismo, la administración de antibióticos y corticoides prenatales fue mayor en el grupo de prematuros, en comparación con la de bebés nacidos a término. Es una práctica común, antes del parto, la administración antibióticos en el caso de cesáreas, y, en prematuros, corticoides prenatales para favorecer principalmente la maduración pulmonar de los recién nacidos [128].

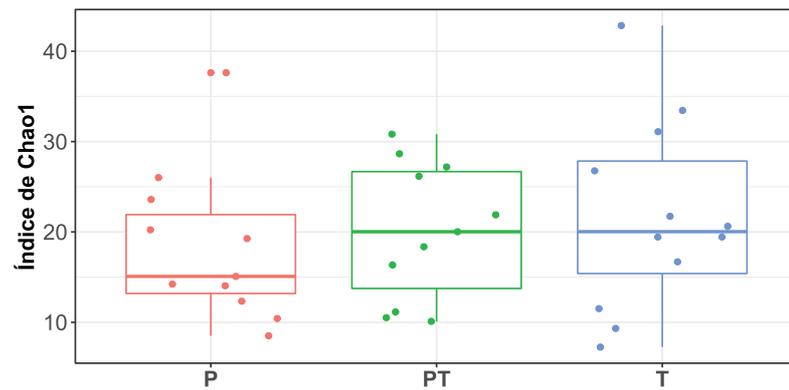
Tabla 1. Datos clínicos del par madre-hijo

Parámetros	Prematuros	A término	Valor de p
Número de muestras	12	12	No aplicable
Número de madres	12	12	No aplicable
Días posteriores al parto, 1 ^{er} muestra	8 ± 3	8 ± 3	0,799 ²
Días posteriores al parto, 2 ^{da} muestra	22 ± 9	No aplicable	No aplicable
Relación parto por vaginal/cesárea	3: 9	4: 8	No aplicable
% cesáreas	75	67	No aplicable
Edad gestacional (semanas)	33,4 ± 1,2	38,3 ± 1,2	0,000 ¹
Peso (g) del bebé al nacer	1968 ± 308	2925 ± 484	0,000 ¹
Sexo (M/F)	6: 6	5: 7	No aplicable
Edad (años) de las madres	25,7 ± 7,5	29,1 ± 8,2	0,300 ¹
Alergias de las madres (Sí/No)	5: 7	4: 7	No aplicable
Diabetes antes del embarazo (Sí/No)	0: 12	1: 11	No aplicable
Hipo/Hiper Tiroidismo (Sí/No)	2: 10	1: 11	No aplicable
Anemia durante el embarazo (Sí/No)	2: 10	2: 10	No aplicable
Diabetes gestacional (Sí/No)	2: 10	2: 10	No aplicable
Corticoides antenatales (Sí/No)	11: 1	2: 10	No aplicable
Antibióticos durante el embarazo (Sí/No)	11: 1	8: 4	No aplicable
Fumadora activa durante el embarazo (Sí/No)	2: 10	2: 10	No aplicable
Fumadora pasiva durante el embarazo (Sí/No)	5: 7	3: 9	No aplicable

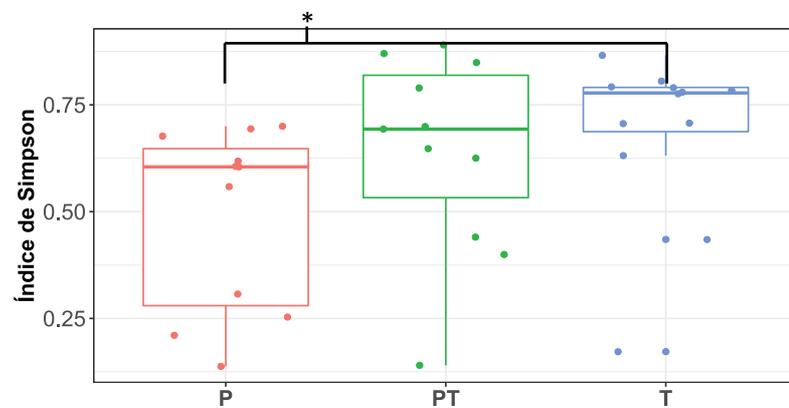
¹Prueba T de *student* para muestras independientes para datos paramétricos o ²Prueba de la U de Mann-Whitney para datos no paramétricos, *p < 0,05, significativo.

Posteriormente, con el objetivo de caracterizar la comunidad microbiana de bebés prematuros y a término, se realizó el secuenciamiento masivo del gen 16S ARNr a partir de las muestras de leche materna. Primero, se restaron las secuencias del control de secuenciación (control negativo) a cada una de las secuencias obtenidas de las muestras de leche materna. Luego de la asignación taxonómica, se eliminaron, además, las secuencias con una abundancia < 10 secuencias y aquellas asignadas al dominio Archaea y al filo Cyanobacteria de acuerdo a otros trabajos de referencia [129,130]. En total, 8 OTUs fueron asignadas a Archaea y 77 OTUs al filo Cyanobacteria. Se descartó la muestra PT1 por tener un número insuficiente de secuencias (< 10.000) en comparación con las demás muestras (12.437 a 129.871 secuencias) y la muestra P6 debido a que estaba contaminada. Teniendo en cuenta el tratamiento de los datos, se procedió a realizar la curva de rarefacción y con ella se determinaron los índices de diversidad y riqueza (Chao1, Simpson, Shannon). Al analizar los grupos independientes entre sí, P vs. T y PT vs. T, mediante la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos, se observó una mayor diversidad bacteriana en las muestras de bebés a término en comparación con el grupo de prematuros, según el índice de Simpson ($p = 0,004$). Con relación al índice Shannon, se observó la misma tendencia, aunque las diferencias entre los grupos P y T no fueron significativas ($p = 0,056$). Al contrario, los grupos PT vs. T no presentaron diferencias significativas en los índices de diversidad y riqueza (Fig. 4).

1 a.



b.



c.

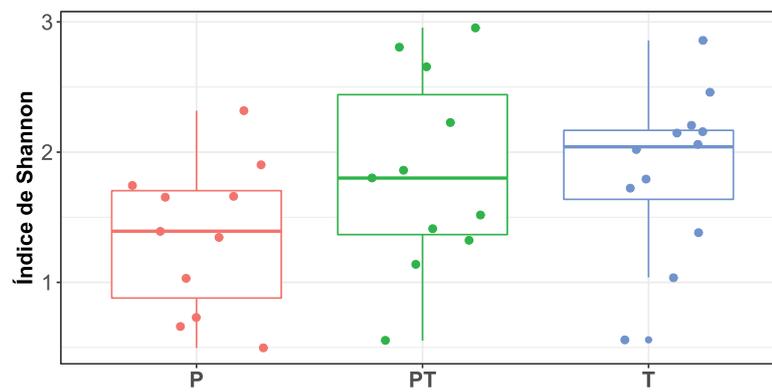


Figura 4. Diversidad alfa y riqueza de las muestras de leche materna. **a.** Índice de riqueza, Chao1, **b.** Índice de diversidad alfa, Simpson y **c.** Índice de diversidad alfa, Shannon. Grupo de madres de bebés prematuros, P (días 3 a 12 de posparto) y PT (cuando hubieran alcanzado las 37 o más semanas de gestación) y el grupo a término, T. Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes no paramétricas, * $p < 0,05$.

A continuación, se realizó el gráfico NMDS (Fig. 5) para analizar la distribución de las muestras en función a su similitud. Se puede observar que las muestras P y T se segregan a la izquierda y derecha del gráfico, respectivamente, mientras que las muestras PT presentan una mayor dispersión, sobreponiéndose entre las muestras P y T.

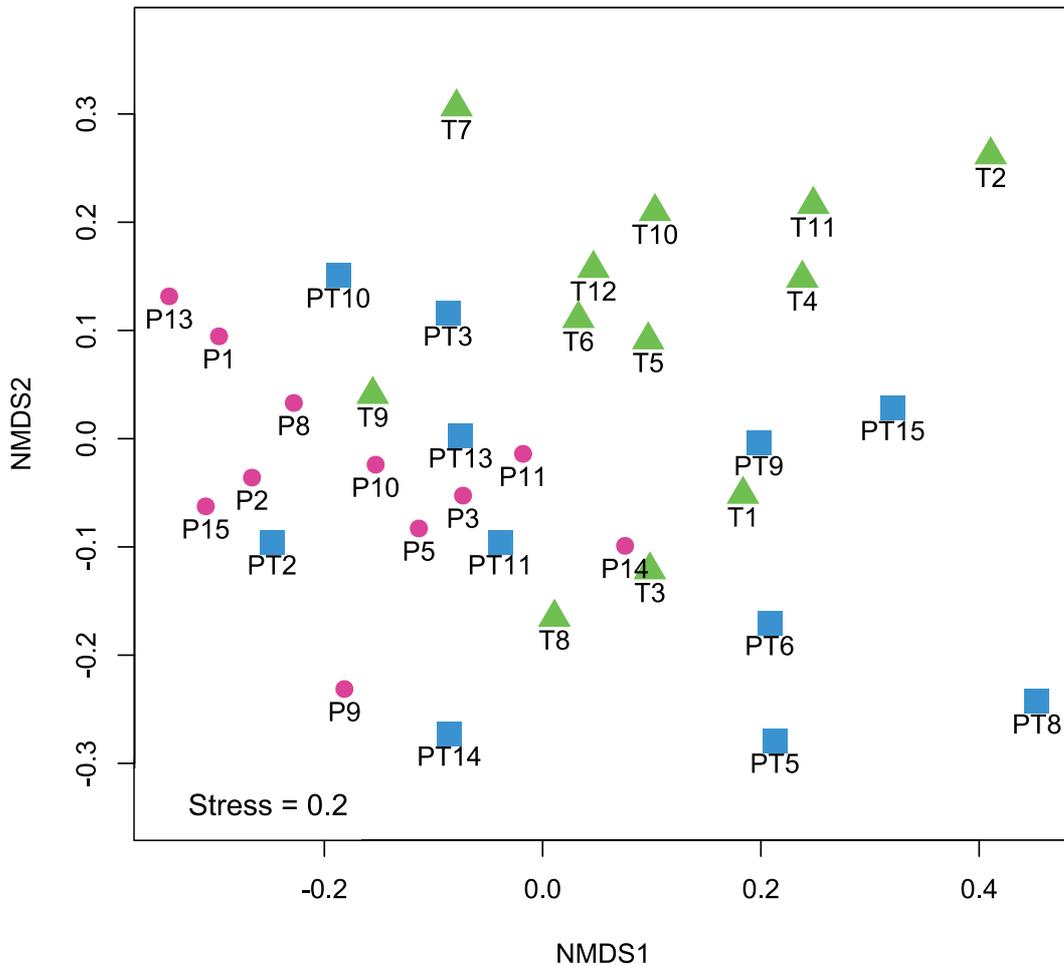


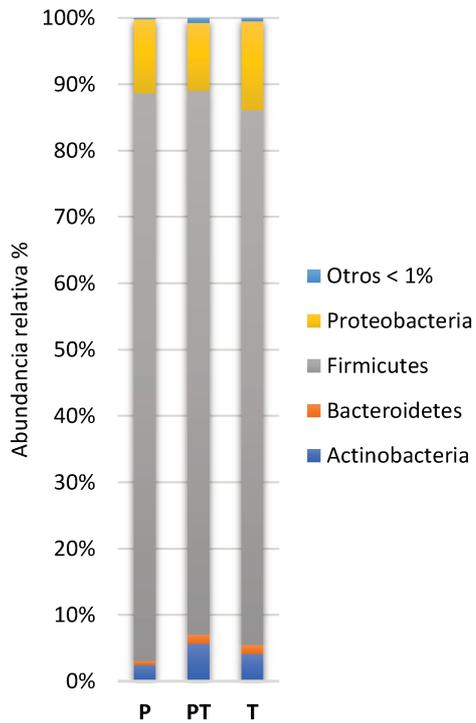
Figura 5. Gráfico NMDS (siglas en inglés de *Non-Metric Multidimensional Scaling*) correspondientes a las muestras de leche materna de los siguientes grupos: grupo de madres con bebés prematuros, P (días 3 a 12 de posparto) y PT (cuando hubieran alcanzado las 37 o más semanas de gestación) y el grupo a término, T.

Por otro lado, la composición taxonómica de las muestras de leche materna fue estudiada mediante un análisis PERMANOVA, observándose que las muestras P

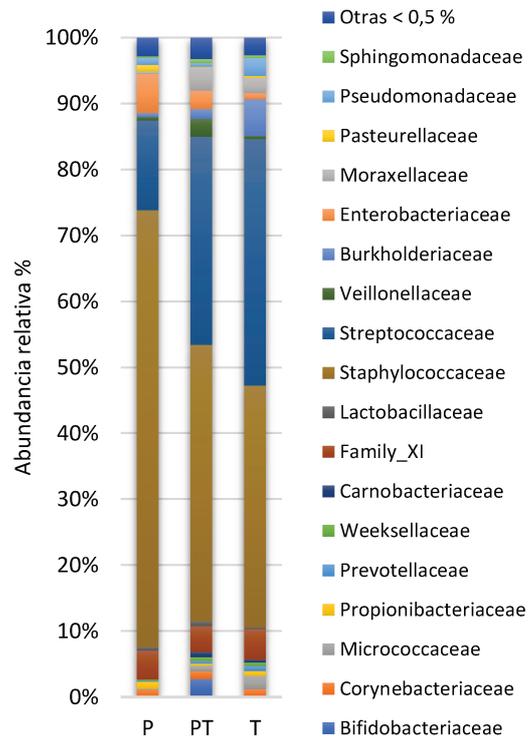
resultaron significativamente diferentes a las muestras T ($p = 0,004$), pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los demás grupos estudiados. Luego se realizó un análisis de SIMPER para determinar cuáles fueron las OTUs que contribuyeron más en las diferencias observadas. La OTU 1 correspondiente al género *Staphylococcus* contribuyó con el 30 % de las diferencias y, en conjunto con las OTU 2 y OTU 3 del género *Streptococcus*, alcanzaron un total del 54 % de las disimilitudes observadas entre las muestras. Luego, la composición taxonómica de cada uno de los filos fue analizada individualmente. El filo Bacteroidetes no presentó diferencias entre los grupos evaluados. Al contrario, en los filos Proteobacteria y Actinobacteria las muestras PT y P presentaron diferencias significativas en relación con el grupo T. En el caso del filo Proteobacteria, entre PT y T la significancia fue 0,0003, mientras entre P y T fue de 0,0009. La significancia para el filo Actinobacteria fue de 0,04 entre los grupos P y T, y 0,014 entre los grupos PT y T. Cuando el filo Firmicutes fue analizado, solo hubo diferencias significativas entre el grupo P y T ($p = 0,002$). El análisis de SIMPER para el filo Proteobacteria determinó que la OTU 19 (género *Ralstonia*) contribuyó con un 12 % de las disimilitudes observadas y, a continuación, las OTUs 11 (género *Klebsiella*) y 18 (género *Acidovorax*) contribuyeron aproximadamente con el 6 % individualmente. En el filo Actinobacteria, los géneros *Corynebacterium_1* (OTU 16), *Cutibacterium* (OTU 17), *Rothia* (OTU 36) y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (OTU 14) contribuyeron aproximadamente con el 50 % de las disimilitudes observadas. En particular, en el filo Firmicutes la OTU 1 (género *Staphylococcus*) contribuyó con un 40 % de las disimilitudes observadas y la OTU 2 (género *Streptococcus*) con el 20 %, entre el grupo P y T.

A continuación, se muestran las gráficas de abundancias relativas a nivel filo, familia y género (Fig. 6). En todos los grupos estudiados, el filo Firmicutes fue el más abundante (85,6 – 80,5 %), seguido por los filos Proteobacteria (10,2 – 13,4 %), Actinobacteria (2,5 – 5,6 %) y Bacteroidetes (0,6 – 1,4 %) (Fig. 6a). A nivel filo no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados. El análisis posterior a nivel familia y género se realizó por pares de muestras, aquellas independientes entre sí (T vs. P y T vs. PT) y el par de muestras provenientes de las mismas madres a distintos tiempos (P vs. PT).

6a.



b.



c.

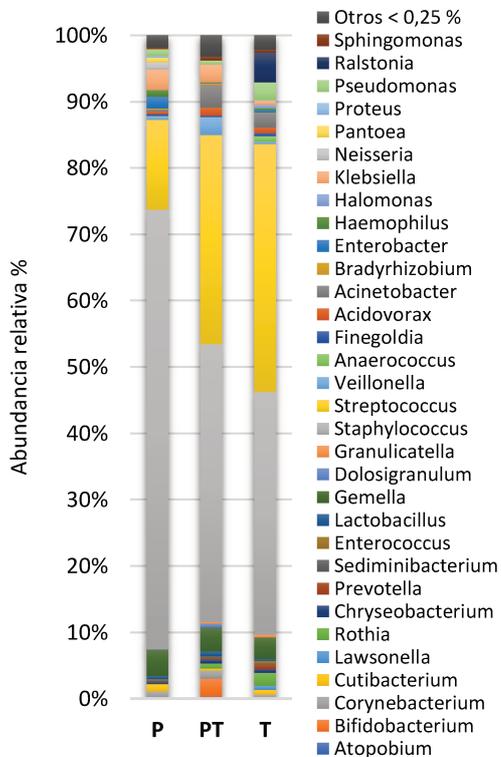


Figura 6. Abundancia relativa del gen 16S ARNr. A nivel, **a.** Filo, **b.** Familia y **c.** Género. Grupo de madres con bebés prematuros, P (días 3 a 12 de posparto) y PT (cuando hubieran alcanzado las 37 o más semanas de gestación) y el grupo a término, T.

A nivel familia se estudiaron el par de muestras independientes, T vs. P, se observó una mayor abundancia en el grupo T en comparación con el grupo P de las familias Streptococcaceae (37,41 vs. 13,59 %, $p = 0,006$) y Micrococcaceae (2,01 vs. 0,14 %, $p = 0,001$) (Fig. 6b). Por otro lado, el grupo T presentó una menor abundancia de las familias Staphylococcaceae (36,65 vs. 66,27 %, $p=0,004$) y Rhodobacteraceae (0,03 vs. 0,13 %, $p = 0,019$), en comparación con el grupo P (Fig. 6b). Luego, se observó que el grupo T en relación con el grupo PT presentó menor abundancia de las familias Atopobiaceae (0,00 vs. 0,29 %, $p = 0,013$), Veillonellaceae (0,43 vs. 2,70 %, $p = 0,044$) y Beijerinckiaceae (0,09 vs. 0,29 %, $p = 0,016$). En cambio, el grupo T presentó mayor abundancia de las familias Propionibacteriaceae (0,75 a 0,33 %, $p = 0,019$) y Pseudomonadaceae (2,71 vs. 0,56 %, $p = 0,037$) en comparación con el grupo PT. Cuando se analizaron las muestras provenientes de las mismas madres, P vs. PT, se observó un incremento significativo en el grupo PT de las familias Carnobacteriaceae (0,02 a 0,77 %, $p = 0,028$), en comparación al grupo P.

A nivel género (Fig. 6c), el grupo T en comparación con el P presentó, una menor abundancia relativa de los géneros *Staphylococcus* (36,65 vs. 66,26 %, $p = 0,004$) y *Paracoccus* (0,01 vs. 0,10 %, $p = 0,044$), y una mayor abundancia de los géneros *Streptococcus* (37,33 vs. 13,57 %, $p = 0,007$), *Ralstonia* (4,49 vs. 0,00 %, $p = 0,006$), *Rothia* (1,95 vs. 0,03 %, $p = 0,000$) y *Stenotrophomonas* (0,15 vs. 0,00 %, $p = 0,037$). El grupo T en comparación con el grupo PT presentó una mayor abundancia relativa de los géneros *Ralstonia* (4,49 vs. 0,00 %, $p = 0,006$), *Cutibacterium* (0,75 vs. 0,33 %, $p = 0,016$) y *Pseudomonas* (2,71 vs. 0,56 %, $p = 0,037$), así como también una menor abundancia en los géneros *Atopobium* (0,00 vs. 0,29 %, $p = 0,013$) y *Methylobacterium* (0,06 vs. 0,19 %, $p = 0,013$). Cuando se compararon las muestras de prematuros entre sí, se observó un aumento en el grupo PT de los géneros *Dolosigranulum* (0,01 a 0,52 %, $p = 0,043$) y *Rothia* (0,03 a 0,76 %, $p = 0,021$) y una disminución del género *Enterobacter* (1,80 a 0,06 %, $p = 0,028$) en comparación con el grupo P inicial. Por otro lado, el género *Veillonella* tendió a presentar una mayor abundancia en el grupo PT en comparación con el grupo P (2,69 vs. 0,51 %, $p = 0,070$) y el grupo T (2,69 vs. 0,37 %, $p = 0,051$), pero estas diferencias no fueron significativas. Otro género de interés como *Lactobacillus* tendió a presentar mayor abundancia en el grupo PT en comparación con el grupo T (0,27 vs. 0,74 %, $p = 0,090$),

pero estas diferencias no fueron significativas. En la Tabla 2 se resumen los géneros que presentaron mayores diferencias entre los grupos estudiados.

Debido a la abundancia del género *Staphylococcus*, se procedió a analizar las especies identificadas: *Staphylococcus aureus* (OTU 6) y especies no cultivables de *Staphylococcus* (OTU 1 y 4). Ambas especies presentaron solo diferencias significativas entre los grupos P y T por todos los métodos estadísticos empleados. Aunque, la abundancia de *S. aureus* fue mayor en las muestras T en comparación con las muestras P (10,12 vs. 0,30 %, $p = 0,000$). Por el contrario, especies no cultivables de *Staphylococcus* fueron menores en términos de abundancia relativa en las muestras T en comparación con las muestras P (26,52 vs. 65,77 %, $p = 0,002$). La especie *Staphylococcus haemolyticus* presentó menor abundancia en grupo T en comparación con el grupo P (0,00 vs. 0,20 %, $p = 0,007$) y grupo PT (0,00 vs. 0,08 %, $p = 0,004$).

Tabla 2. Resumen de las diferencias significativas entre los grupos estudiados a nivel género.

Filo	Familia	Género	Grupos		Valor de p
			T	P	
Firmicutes	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	36,65	66,26	0,004 ^{1*}
	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	37,33	13,57	0,007 ^{1*}
Proteobacteria	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	4,49	0,00	0,006 ^{1*}
	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	0,15	0,00	0,037 ^{1*}
	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>	0,01	0,10	0,044 ^{1*}
Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Rothia</i>	1,95	0,03	0,000 ^{1*}
			T	PT	
Firmicutes	Veillonellaceae	<i>Veillonella</i>	0,37	2,69	0,051 ¹
	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	0,27	0,74	0,091 ¹
Proteobacteria	Beijerinckiaceae	<i>Methylbacterium</i>	0,06	0,19	0,013 ^{1*}
	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	4,49	0,00	0,006 ^{1*}
	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	2,71	0,56	0,037 ^{1*}
Actinobacteria	Atopobiaceae	<i>Atopobium</i>	0,00	0,29	0,013 ^{1*}
	Propionibacteriaceae	<i>Cutibacterium</i>	0,75	0,33	0,016 ^{1*}
			P	PT	
Firmicutes	Carnobacteriaceae	<i>Dolosigranulum</i>	0,01	0,52	0,043 ^{2*}
	Veillonellaceae	<i>Veillonella</i>	0,51	2,69	0,070 ²
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	1,80	0,06	0,028 ^{2*}
	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	1,04	0,56	0,075 ¹
Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Rothia</i>	0,03	0,76	0,021 ^{2*}

¹Prueba T de *student* para muestras independientes para datos paramétricos o Prueba de la U de Mann-Whitney para datos no paramétricos.

²Prueba T para muestras dependientes para datos paramétricos o la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

*p < 0,005, significativo.

5. Discusión

La microbiota de la leche materna cumple un rol decisivo en el desarrollo del sistema inmune asociado a la mucosa intestinal del recién nacido. Martín y col. (2003) fueron los primeros en identificar mediante técnicas independientes del cultivo, especies de lactobacilos comensales en leche materna y luego, en años posteriores, numerosos estudios confirmaron sus observaciones y vincularon las cepas aisladas con posibles beneficios para el recién nacido, principalmente en la modulación del sistema inmunológico [23,26,131]. Actualmente, gracias a las tecnologías modernas de secuenciación masiva lograron detectarse una gran variedad de microorganismos, en donde los géneros más predominantes serían *Staphylococcus* y *Streptococcus* independientemente de la región geográfica del mundo [132]. La misma tendencia se observó en nuestro estudio. Además, los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* fueron los que contribuyeron en mayor medida a las diferencias observadas entre los grupos estudiados. A pesar de las similitudes, la predominancia de diversos géneros bacterianos en leche materna parece cambiar según la región geográfica. Por ejemplo, cuando se compararon muestras de leche materna de China, Sudáfrica, Finlandia y España, las mujeres de China presentaron los mayores niveles de *Streptococcus*, mientras que las muestras de mujeres de España contenían mayor proporción de *Propionibacterium* y *Pseudomonas* [133]. De allí la importancia de este estudio como pionero en Argentina, debido a que múltiples factores afectan la microbiota de la leche materna, incluyendo los hábitos alimentarios de las madres, edad y IMC, entre otros [50].

La edad gestacional es otro factor determinante de la composición de la microbiota de la leche materna. Un estudio observó menor abundancia de *Bifidobacterium* en madres de bebés prematuros con respecto a madres con bebés a término [134]. En nuestro estudio, la composición taxonómica presentó diferencias entre la leche materna de las muestras P y T, pero no entre las muestras PT y T, lo que sugeriría que la microbiota de la leche materna en madres de bebés prematuros se asemejaría al grupo a término luego de varios días o semanas posteriores al parto, a medida que avanza la lactancia. Un patrón similar fue observado al analizar los índices de diversidad Shannon y Simpson, pero no así del índice de riqueza, Chao1. En otro estudio llevado a cabo por

Urbaniak y col. (2016) (39 sujetos con un N por grupo de entre 8 y 11 personas) no se observaron diferencias en diversidad y/o riqueza entre la leche materna de madres de bebés prematuros o a término. Estos resultados, contrapuestos con los resultados observados en nuestro trabajo, podrían deberse al limitado número de muestras en ambos estudios. Por otro lado, un estudio más reciente sobre la microbiota de leche materna en madres de bebés prematuros observó que los factores que conllevan a una menor diversidad están positivamente asociados al uso de antibióticos y a un IMC >25 kg m⁻², es decir, madres con obesidad o sobrepeso antes del embarazo [130].

Los filos Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes fueron los más abundantes, en similitud con otros estudios [11]. Cuando se comparó la composición taxonómica del filo Firmicutes, se observó que la microbiota de la leche materna en madres de bebés prematuros, al transcurrir los días, se asemejaba a la microbiota correspondiente a madres de bebés a término, aunque no así los filos Proteobacteria y Actinobacteria. En concordancia con el SIMPER, cuando se analizaron las diferencias entre T vs. P dentro del filo Firmicutes, las familias Streptococcaceae (género *Streptococcus*) y Staphylococcaceae (género *Staphylococcus*) fueron las responsables de las mayores diferencias observadas. La relación de abundancias relativa de *Streptococcus/Staphylococcus* fue mayor en madres con bebés a término con respecto a la leche materna de madres de bebés prematuros, y estas diferencias se reflejaron también en el gráfico NMDS (Fig. 5). Se ha observado en otros trabajos mayores niveles del género *Staphylococcus* en madres con sobrepeso u obesidad, en comparación con madres con un IMC menor [135] y en muestras con mayores niveles de ácidos grasos [10].

Después de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*, el tercer género con mayor abundancia fue *Ralstonia* perteneciente a la familia Burkholderiaceae y del filo Proteobacteria. Se encontró el género *Ralstonia* casi exclusivamente en las muestras de leche materna de madres de bebés a término, en donde su abundancia fue aproximadamente del 4,5 % en concordancia con otros estudios de Canadá [31], India [35], Suiza [15] y EEUU [136]. Patel y col. (2017) asociaron una elevada abundancia del género *Ralstonia*, junto con otros géneros aerotolerantes como *Aeromonas*, *Staphylococcus*,

Klebsiella, *Serratia*, *Enterococcus* y *Pseudomonas*, como un marcador de mastitis en la leche materna. A pesar de que la leche materna en madres de bebés a término presentó la menor abundancia del género *Staphylococcus* en relación con los tres grupos estudiados, en particular la especie identificada como *S. aureus* fue mayor en muestras de leche materna en madres de bebés a término. La familia Pseudomonadaceae, en particular el género *Pseudomonas*, predominó en las muestras de bebés a término, y la abundancia fue significativamente menor en el segundo muestreo a madres de bebés prematuros. *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas* se han reportado como los géneros y especies predominantes en los casos de mastitis aguda y/o subaguda [137]. Por lo tanto, en el caso de leche materna de bebés a término el incremento tanto de *Ralstonia*, *S. aureus* y *Pseudomonas* podría estar relacionado con la mayor probabilidad de contraer mastitis [35]. Asimismo, el género *Pseudomonas* podría incrementarse con el uso de sacaleches en vez de la extracción manual [50]. Otra especie, *Staphylococcus haemolyticus*, se encontró casi exclusivamente en las muestras de madres de bebés prematuros. Se ha reportado esta especie en mayor abundancia en la leche materna de bebés prematuros respecto a bebés a término y a pesar de que es generalmente asociada a la sepsis tardía de prematuros, se considera que su origen no sería la leche materna [138].

En el filo Actinobacteria, la familia Micrococcaceae, y en particular el género *Rothia*, presentó diferencias significativas entre los grupos P y T, observándose una preponderancia en la microbiota de la leche materna de madres de bebés a término en comparación con la de bebés prematuros. En la segunda toma de muestra, los niveles de *Rothia* tendieron a incrementarse en comparación al primer muestreo en las madres de bebés prematuros y, las diferencias observadas entre la segunda toma muestras y la de bebés a término, no fueron significativas. Se ha reportado la presencia del género *Rothia* en muestras de leche materna de diferentes países como España [10], Suiza [139], Finlandia [33], Noruega [140], EEUU [34] y China [141]. El género *Rothia* junto con otros géneros como *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Veillonella* fueron identificados tanto en leche materna como en las heces de bebés del par madre-hijo, por lo cual podría ser transferido desde la madre al hijo a través de la lactancia [34]. Asimismo, una disminución del género *Rothia* en la microbiota intestinal en las etapas tempranas de la niñez fue relacionado con un mayor riesgo de padecer asma en la adultez [63]. Por el

contrario, un aumento del mismo se observó en la leche materna de madres que consumían más fibras insolubles [142].

En relación a las familias y géneros menos abundantes, las familias Atopobiaceae (género *Atopobium*), Lactobacillaceae (género *Lactobacillus*), Veillonellaceae (género *Veillonella*) y Beijerinckiaceae (género *Methylobacterium*) se encontraron en mayor abundancia en las muestras PT en comparación con las muestras T. *Lactobacillus* y *Veillonella* pueden ser transferidos desde la leche materna a la microbiota intestinal del recién nacido [34]. La menor abundancia de *Veillonella* como del género *Rothia* mencionado en el párrafo anterior, ha sido detectado en niños con mayor probabilidad de padecer asma en su adultez [63]. Por otro lado, los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en leche materna fueron asociados con una menor incidencia de infecciones como mastitis y otras infecciones neonatales [22], además de su importancia en la correcta maduración del sistema inmune del recién nacido [143]. Debido a los beneficios bien conocidos de los lactobacilos y las bifidobacterias, varias especies fueron aisladas de leche materna y estudiadas como potenciales probióticos [112,144,145].

Finalmente, el género *Enterobacter* (filo Proteobacteria) disminuyó en el segundo muestreo de leche materna del grupo de prematuros, mientras que aumentó el género *Dolosigranulum* (filo Firmicutes). *Enterobacter* podría estar presente en la piel de la madre y la cavidad oral del recién nacido [146], y principalmente en la microbiota intestinal de bebés prematuros [147]. Asimismo, se han asociado algunas especies de *Enterobacter* con un mayor riesgo de padecer enterocolitis necrotizante [148] y culminar en sepsis de prematuros [149]. Por otro lado, un estudio que analizó la microbiota nasofaríngea y el tipo de alimentación que recibían los bebés, leche materna o fórmula infantil, asoció la predominancia y mayor abundancia de los géneros *Dolosigranulum* y *Corynebacterium* con la leche materna y una menor ocurrencia de patologías del tipo respiratorias [150]. Con respecto a los géneros *Cutibacterium* (filo Actinobacteria) y *Stenotrophomonas* (filo Proteobacteria), se ha reportado su presencia en distintas regiones del mundo, pero su implicancia sobre la salud y factores relacionados aún permanece sin dilucidar [11]. Aunque, este último *Stenotrophomonas* parece aumentar en la leche materna luego de tratamientos quimioterapéuticos [151].

En el proceso de maduración de la leche materna desde el calostro (5-6 días después del parto) hasta la leche madura (\cong 1 mes después del parto) existen no solo cambios en la composición de macronutrientes [152], sino también en la microbiota. Algunos estudios sugieren que luego de los primeros 10 días hay una disminución del género *Staphylococcus* y un aumento de otros géneros como *Bifidobacterium* [153], *Rothia* [140] *Veillonella* [47,140,142], *Granulicatella* [140,142], *Lactobacillus* [153,154] y *Methylobacterium* [140]. Nuestros resultados, mostraron un aumento en el género *Methylobacterium* en el segundo muestreo de leche materna en el grupo de prematuros. Asimismo, se ha reportado un aumento de la diversidad en los días posteriores al parto [140]. En nuestro estudio, las muestras de leche materna de madres a término presentaron, en general, mayor diversidad alfa (índice de Simpson), como así también menor abundancia del género *Staphylococcus*, pero mayor abundancia del género *Rothia*, en comparación con las muestras de leche materna de bebés prematuros. Cuando la segunda muestra de leche materna de bebés prematuros se comparó con las de bebés a término, estas diferencias disminuyeron asemejándose a la microbiota de la leche materna de bebés a término. Estos resultados sugerirían que la microbiota de una leche materna en madres con bebés prematuros es alcanzada tardíamente, en comparación a la de los bebés a término, y no siempre logra asemejarse a la composición de la leche materna de madres de bebés a término. En un estudio reciente con 86 madres con bebés prematuros en el cual se tomaron al menos tres muestras de leche materna en semanas posteriores al parto, se observó una microbiota individualizada fuertemente afectada por el uso de antibióticos y el IMC previo al embarazo. Por ejemplo, luego de 8 semanas posteriores al parto se observó un aumento de la diversidad de la microbiota de la leche materna en los bebés prematuros, pero en aquellas madres con obesidad este aumento fue tardío, en comparación con las madres con normopeso [130]. Por lo tanto, la dispersión observada en el gráfico NMDS, principalmente en las muestras PT y algunas T o P, podría estar relacionada con otros factores como el uso de antibióticos, tabaquismo durante el embarazo, IMC y lactancia no exclusiva, entre otros que deberían tenerse en cuenta en futuros estudios [130,155].

6. Conclusión

A pesar de que el estudio presentó limitaciones, como el tamaño de la muestra y la ausencia de datos clínicos de algunas madres donantes, este trabajo es el primer reporte de la composición de la microbiota de leche materna en Argentina, en donde los filos Firmicutes y Proteobacteria fueron los más abundantes. Es importante destacar también que los datos clínicos faltantes no se pudieron recabar, al tratarse en muchos de los casos de poblaciones vulnerables con acceso limitado a la salud y/o educación. Asimismo, los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* fueron predominantes y se sugiere que estarían implicados en las diferencias observadas entre los grupos prematuros y a término. En particular, el género *Rothia* presente solo en las muestras T y PT podría estar asociado con la maduración tardía de la microbiota de bebés prematuros. La importancia de este género radica en que su presencia se asocia con una menor probabilidad de padecer asma en la adultez. La leche materna de bebés a término presentó también una mayor diversidad en relación con la de madres de bebés prematuros. Se observaron, además, diferencias en la composición taxonómica entre la leche materna de bebés a término y prematuros. Estos resultados, si bien limitados, destacan la importancia de estudiar los factores determinantes de los cambios en la microbiota de la leche materna y sus efectos sobre la salud del bebé, y contribuyen además a llevar a cabo acciones tendientes a promover la lactancia materna.

Capítulo 2

Potencial probiótico y tecnológico de cepas aisladas de leche materna

1. Introducción

La leche materna es el mejor alimento para el recién nacido dado que está especialmente adaptada para satisfacer los requerimientos nutricionales e inmunológicos del bebé [156]. Se conoce, además, que confiere protección contra enfermedades del tipo respiratorias o alérgicas [157] debido a la presencia de inmunoglobulinas, lactoferrina, HMOs, células inmunocompetentes y una variedad de compuestos antimicrobianos [17]. Asimismo, la microbiota de la leche materna cumple un rol importante al ser una fuente continua y dinámica de bacterias beneficiosas para la mucosa intestinal del recién nacido. Algunos estudios, por ejemplo, destacan las diferencias entre la microbiota intestinal de los niños alimentados con leche materna y aquellos con fórmulas infantiles [158,159]. En este sentido, la suplementación de fórmulas infantiles con bacterias probióticas aisladas de leche materna podría mimetizar, al menos parcialmente, algunos de los beneficios de la leche materna [160]. Un metaanálisis de artículos publicados entre los años 2003 y 2017, determinó que la suplementación de fórmulas infantiles con probióticos disminuye el riesgo de padecer enterocolitis necrotizante y sepsis, así como también favorece el aumento de peso en bebés prematuros [161].

Aunque muchos de los componentes de la leche humana parecen ser similares en distintas regiones del mundo, varios factores como la genética, la dieta y el medio ambiente pueden condicionar la microbiota de la leche materna y sus metabolitos [162]. De allí la relevancia de aislar potenciales probióticos de ecosistemas locales que podrían cumplir con requerimientos nutricionales específicos de cada región [163]. Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son utilizados generalmente en la industria alimenticia como probióticos debido a su estatus GRAS [74], y a su vez, se reconoce a la leche materna como una fuente de estos microorganismos [101,164]. Algunos reportes científicos demostraron que cepas aisladas a partir de la leche materna podrían presentar beneficios al consumidor [90,165,166], incluyendo la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 aislada previamente en nuestro laboratorio [9,91]. Como se mencionó anteriormente, para seleccionar nuevas cepas de probióticos, es necesario considerar no solo la funcionalidad, sino también la seguridad y la aptitud tecnológica para ser

incorporadas a los diferentes productos utilizados como matrices. Por ejemplo, se observó que ciertas especies de bifidobacterias aisladas de leche materna no eran resistentes al secado *spray* [167]. Por lo tanto, aunque pueden considerarse como potenciales probióticos por su origen, podrían no ser adecuadas para ser aplicadas en procesos industriales. Sin embargo, otras cepas de bifidobacterias aisladas en nuestro laboratorio demostraron resistencia al secado *spray* y propiedades antiinflamatorias [91]. En este capítulo, nos enfocamos en el aislamiento de lactobacilos a partir de leche materna, que cumplan con los requerimientos tecnológicos y funcionales para ser utilizados en un futuro como cultivos probióticos.

2. Objetivos

- Aislar e identificar cepas de lactobacilos a partir de muestras de leche materna para formar una colección de cepas de este origen.
- Caracterizar la funcionalidad de las cepas a través de estudios *in vitro* e *in vivo*, con particular interés en la capacidad de promover la salud intestinal.
- Optimizar la formulación de medios de cultivo para la producción de biomasa y analizar la respuesta a factores tecnológicos de interés en alimentos.

3. Materiales y métodos

3.1 Aislamiento de microorganismos de leche materna

Las muestras de leche materna fueron obtenidas a partir de 104 madres de la Provincia de Santa Fe, entre abril y diciembre de 2016. Las muestras obtenidas pertenecían a madres donantes del hospital público J. B. Iturraspe, además de voluntarias espontáneas de la ciudad de Santa Fe. Se brindó información oral y escrita a todas las participantes (S3). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética del CCT-CONICET Santa Fe. Se recolectaron entre 1 a 3 muestras de leche materna (3 a 5 mL) por madre, entre los días 2 y 30 posparto, obteniéndose un total de 164 muestras. Antes de realizar la toma de muestra, la superficie del pecho fue higienizada con agua y jabón, y los primeros 500 a 600 μ L de leche materna fueron descartados. Luego, las muestras fueron recolectadas en un recipiente estéril e inmediatamente refrigeradas a 5 °C y procesadas en el laboratorio dentro de las primeras dos horas de la toma de muestra.

Se realizaron diluciones seriadas de las muestras en agua de peptona al 0,1 % (p/v) (Microquin, Santa Fe, Argentina) y se sembraron en placas de agar MRS (Biokar, Beauvais, Francia). A continuación, se incubaron a 37 °C por 72 h, en anaerobiosis (AnaeroPack-Anaero, Mitsubishi Gas Chemical, Japón). Las colonias que presentaron morfología bacilar en el microscopio de contraste de fases (1000 \times) fueron aisladas y purificadas. Además, se verificó que los aislamientos conservados sean Gram positivos, no móviles y catalasa negativos. Los aislamientos presuntivos de ser lactobacilos se congelaron en caldo MRS con 20 % (v/v) de glicerol a -70 °C.

3.2 Identificación de los aislamientos

La identificación preliminar de los aislamientos se llevó a cabo mediante el análisis de los espectros peptídicos obtenidos por MALDI-TOF-MS (siglas en inglés de *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*) y se confirmó mediante la secuenciación parcial del gen 16S ARNr [168]. La identificación por MALDI-TOF-MS consistió en tomar una pequeña porción de una colonia fresca a identificar y distribuirla en una placa específica de acero. Luego, se cubrió cada muestra con 1 μ L de

una solución matriz, compuesta por ácido α -ciano-4-hidroxicinámico y se las dejó secar expuestas al aire. Como control positivo se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5- α . El software SARAMIS (Kratos Analytical Ltd., Reino Unido) fue empleado para el análisis posterior de los espectros. El mayor porcentaje de similitud con la base de datos de referencia (SARAMIS) se tuvo en cuenta para la asignación taxonómica de las muestras. La identidad solo se consideró positiva cuando los porcentajes de similitud fueron mayores al 70 %. Esta determinación fue realizada por el laboratorio de Espectrometría de Masas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

La identidad de las cepas fue confirmada mediante técnicas de biología molecular. Con este objetivo, se amplificaron fragmentos de 1500 pb correspondientes al gen 16S ARNr utilizando como cebadores: pA *forward* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y pH *reverse* (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') [168]. Procedimientos estandarizados fueron empleados para la extracción de ADN, la electroforesis en geles de agarosa y la amplificación de los fragmentos de ADN [9,169]. Se utilizó el kit "GenElute™ PCRClean-Up Kit" (Sigma-Aldrich, EEUU) para la purificación de los productos de PCR y se realizó el secuenciamiento posterior de los fragmentos a través del servicio de "DNA Macrogen" (Seúl, Corea). El programa "BLAST sequence alignment" de *National Center for Biotechnology Information* fue utilizado para la identificación de los aislamientos [170]. Teniendo en cuenta, las puntuaciones significativas de los alineamientos se realizó la asignación taxonómica de los mismos.

3.3 Análisis de la diversidad genotípica

Para analizar la diversidad genotípica de los aislamientos se realizó una RAPD-PCR, empleando tres cebadores arbitrarios M13 (5'- GAGGGTGGCGGTTCT -3'), 1254 (5'- CCGCAGCCAA-3') y B10 (5'- CTGCTGGGAC -3'), en reacciones independientes entre sí [171]. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L, con 1 μ L de ADN diluido como templado, 2,5 U de la polimerasa Taq (Sigma, EEUU), buffer, 1 \times (Sigma, EEUU), dNTPs, 200 nmol L⁻¹ (Sigma, EEUU) y los cebadores a una concentración final de 1000 nmol L⁻¹ para M13, 800 nmol L⁻¹ para 1254 o 500 nmol L⁻¹

para B10. Las reacciones de RAPD-PCR con los cebadores M13 y 1254 se realizaron según Giraffa y col. (2004), y para las reacciones con el cebador B10 según Binetti y col. (2007). Como estándar, en los geles de agarosa se utilizó el marcador molecular de ADN 1 kb *plus DNA Ladder* (Sigma, EEUU). El *software* BioNumeric 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) se empleó para analizar las imágenes digitales de los geles de agarosa. El método de agrupamientos, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average* (UPGMA) [173], se utilizó para generar el dendrograma a partir de los perfiles de bandas obtenidos, luego de normalizar y medir la densidad de las mismas.

3.4 Ensayo de hidrofobicidad

Se determinó la capacidad de las cepas a adherirse a compuestos hidrocarbonados de cadena larga como n-hexadecano (Merck, Alemania) o xileno (Cicarelli, Argentina), según Vinderola y col. (2004).

3.5 Co-cultivos de macrófagos murinos con las cepas aisladas de leche materna

El ensayo fue realizado según Jorjão y col. (2015). La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC® Number: TIB-71™, LGC Standards [ATCC], Middlesex, Reino Unido), se cultivó en medio completo de Eagle modificado de Dulbecco compuesto (DMEM) por 4,5 g L⁻¹ de Glucosa, L-glutamina y sin piruvato de sodio (Gibco, Life Technologies, EEUU) suplementado al 10 % (v/v) con suero fetal bovino inactivado por calor (FBS, Gibco, Life Technologies, EEUU) y 10 % (v/v) de una solución de antibióticos (Penicilina, 10.000 U ml⁻¹ y Estreptomina, 10.000 µg mL⁻¹, Gibco, Life Technologies, EEUU). Los cultivos celulares se incubaron durante siete días a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ y cada dos días el medio de cultivo fue renovado. Los recuentos de células viables se llevaron a cabo en cámara de Neubauer mediante tinción con 0,5 % (v/v) de azul tripán (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU).

Para los co-cultivos, se colocaron 10⁶ células de macrófagos por pocillo en microplacas de 24 pocillos y se ajustó el volumen a 1 mL. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 18 h con 5 % CO₂ para favorecer la adhesión de los macrófagos al fondo de las cubetas. Luego, se descartó el sobrenadante, se lavaron 2 veces con PBS estéril (pH 7,4)

y se agregó 500 μL de DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino sin antibióticos. Los cultivos bacterianos (cepas de leche materna en fase estacionaria), se centrifugaron ($6000 \times g$, 10 min, 4 °C) y se lavaron 2 veces con PBS estéril (pH 7,4) para ser luego resuspendidos en DMEM (10% [v/v] de suero fetal bovino, sin antibióticos). Finalmente, se adicionaron las cepas a los pocillos en una relación macrófago: bacteria de 1: 100 en un volumen final de 1 mL con DMEM (10% [v/v] de suero fetal bovino, sin antibióticos). Como control de activación, se utilizó LPS al 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (eBioscience, EEUU). Los co-cultivos fueron incubados durante 4, 6 y 8 h a 37 °C en 5 % CO_2 y los sobrenadantes recolectados fueron centrifugados ($6000 \times g$, 10 min, 4 °C) para la remoción de las células. Los mismos se conservaron a - 70 °C para la posterior cuantificación de IL-10 mediante ELISA con el kit comercial “BD OptEIA Set Mouse IL-10” (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, EEUU), según las indicaciones del fabricante.

3.6 Resistencia a la liofilización y almacenamiento

Las cepas aisladas se desarrollaron a 37 °C en caldo MRS suplementado con 0,1 % (p/v) de L-cisteína (Biopack, Buenos Aires, Argentina) (MRSc) hasta alcanzar la fase estacionaria (18 h). La biomasa fue cosechada por centrifugación ($4000 \times g$, 15 min, 8 °C), se lavó 3 veces con una solución de PBS estéril (pH 7,4) y se resuspendió en 10 % (p/v) de lactosa (L) (Cicarelli S.A., Argentina) o povidex (PDX) (Gelfix, Argentina). Luego, las suspensiones celulares se distribuyeron en viales estériles (2 mL/vial) y se congelaron a - 70 °C por 24 h. El proceso de liofilización se llevó a cabo a - 55 °C y 0,0010 mBar por 22 h, empleando el equipo “Alpha 1-4 LD plus” (Christ, Alemania) y posterior a la liofilización, las muestras deshidratadas fueron cerradas al vacío. Para determinar la viabilidad de los cultivos liofilizados, éstos se resuspendieron al volumen original (2 mL) con agua destilada estéril y se incubaron durante 15 min a 37 °C. Se sembraron diluciones seriadas de las suspensiones celulares en placas de agar MRS y se incubaron a 37 °C durante 48 h en anaerobiosis. Los cultivos liofilizados fueron almacenados a 5°, 22° y 37 °C y la viabilidad fue determinada periódicamente mediante recuentos en agar MRS. Se determinó la actividad acuosa (a_w) a temperatura ambiente de los liofilizados empleando el equipo “Aqua Lab CX-2T” (Aqua Lab, Pullman, Washington, EEUU).

3.7 Reformulación de un medio de cultivo para una producción costo-efectiva de biomasa

Para la reformulación del medio de cultivo, se aplicó un diseño experimental 2^2 factorial (Tabla 3), el cual incluyó tres niveles cualitativos para la variable cepa y tres niveles para las dos variables cuantitativas: extracto de levadura y pluripeptona. Los niveles de la variable cualitativa fueron: *L. gasseri* 70c (A), *L. plantarum* 73b (B) y *L. plantarum* 73a (C). Los niveles de las variables cuantitativas fueron: 0,1, 0,55 y 1 % (p/v) de extracto de levadura y pluripeptona. El modelo asumido fue de segundo orden para x_1 (extracto de levadura) y x_2 (pluripeptona), en donde la variable cualitativa cepa, interacciona con x_1 y x_2 . El modelo tuvo como punto central 0,55 % (p/v) y dos puntos axiales, 0,1 y 1 % (p/v) para las estimaciones de x_1^2 y x_2^2 . Finalmente, el diseño D-óptimo requirió un $N = 15$ ensayos y se representó mediante la siguiente ecuación:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \gamma_1 z_1 + \gamma_2 z_2 + \delta_{11} x_1 z_1 + \delta_{12} x_2 z_1 + \delta_{21} x_1 z_2 + \delta_{22} x_2 z_2 + \epsilon$$

Donde,

$$z_1 = \begin{cases} 1 & \text{Si A es el nivel cualitativo} \\ 0 & \text{otro} \end{cases}$$

$$z_2 = \begin{cases} 1 & \text{Si B es el nivel cualitativo} \\ 0 & \text{otro} \end{cases}$$

Donde x_1 y x_2 son las variables que representan las dos variables cuantitativas y los coeficientes: β_0 es la intercepta; β_1 y β_2 son los coeficientes lineares; β_{12} es el coeficiente de interacción entre los dos factores; β_{11} y β_{22} son los coeficientes cuadráticos, y ϵ es el error. Las respuestas obtenidas (y), se determinaron mediante recuentos celulares en agar MRS (\log_{10} UFC mL⁻¹) y cada ensayo se llevó a cabo por triplicado.

Tabla 3. Diseño 2² factorial y las respuestas obtenidas en log₁₀ UFC mL⁻¹. Las variables del modelo fueron: cualitativas (cepa), con 3 niveles: *L. gasseri* 70c (A) y *L. plantarum* 73b (B) y 73a (C) y cuantitativas: extracto de levadura (x_1) y pluripectona (x_2) en términos de concentración [% p/v].

Medio de cultivo ¹	Corrida	x_1 [% p/v]	x_2 [% p/v]	Cepa ²	Respuesta log ₁₀ UFC mL ⁻¹ ± SD
M1	1	0,1	0,1	A	8,26 ± 0,16
	2	0,1	0,1	B	8,98 ± 0,18
	3	0,1	0,1	C	9,30 ± 0,13
M2	4	0,1	1	A	8,50 ± 0,10
	5	0,1	1	B	9,06 ± 0,04
	6	0,1	1	C	9,15 ± 0,04
M3	7	1	0,1	A	8,33 ± 0,14
	8	1	0,1	B	9,20 ± 0,08
	9	1	0,1	C	9,27 ± 0,02
M4	10	1	1	A	8,59 ± 0,09
	11	1	1	B	9,16 ± 0,07
	12	1	1	C	8,33 ± 0,04
M5	13	0,55	0,55	A	8,46 ± 0,05
M6	14	0,55	1	B	9,09 ± 0,04
M7	15	0,1	0,55	B	9,21 ± 0,15

¹ MRS (formulación comercial) preparado a partir de los ingredientes individuales con extracto de levadura y pluripectona según las concentraciones de esta Tabla.

² A: *L. gasseri* 70c, B: *L. plantarum* 73b, C: *L. plantarum* 73a

SD: desviación estándar

El medio de cultivo MRS se preparó a partir de sus ingredientes: 20 g L⁻¹ de glucosa (Cicarelli, Rosario, Argentina), 1,08 g L⁻¹ de tween 80 (Cicarelli, Rosario, Argentina), 2 g L⁻¹ de fosfato dipotásico (Cicarelli, Rosario, Argentina), 5 g L⁻¹ de acetato de sodio (Cicarelli, Rosario, Argentina), 2 g L⁻¹ citrato de amonio (Cicarelli, Rosario,

Argentina), 0,2 g L⁻¹ de sulfato de magnesio (Cicarelli, Rosario, Argentina), 0,05 g L⁻¹ de sulfato de manganeso (Cicarelli, Rosario, Argentina) y 10 g L⁻¹ de extracto de carne (Microquim S.A., Santa Fe, Argentina) y se le adicionó la cantidad indicada (Tabla 3) de extracto de levadura y pluripeptona (Microquim S.A., Santa Fe, Argentina). Además, el pH fue ajustado a 6,2 ± 0,2. Para realizar los ensayos, se obtuvieron cultivos de las cepas evaluadas en MRSc a 37 °C en fase estacionaria (18 h). Estos cultivos se utilizaron como inóculo al 1 % (v/v). Previamente, los cultivos fueron centrifugados (3000 × g, 15 min y 8 °C), lavados tres veces y resuspendidos en su volumen original con una solución de PBS (pH 7,4). Los ensayos se llevaron a cabo en volúmenes de 10 mL, a 37 °C durante 18 h en anaerobiosis y luego se realizaron los recuentos, en agar MRS, de los cultivos obtenidos en los medios modificados.

3.8 Ensayos *in vivo*

Animales y cepas

Se trabajó con un total de 110 ratones BALB/c, machos, de seis semanas de edad (20,1 ± 1,0 g), provenientes de tres lotes diferentes, obtenidos del Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (CMC-ICiVet-Litoral, CONICET-UNL), Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Los animales fueron mantenidos una semana en el bioterio del INLAIN antes de comenzar las experiencias y distribuidos aleatoriamente en cajas plásticas. Durante los ensayos se mantuvo un ambiente controlado a 21 ± 2 °C con 55 ± 2 % de humedad y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con 20 renovaciones del volumen de aire del ambiente/hora. Los animales fueron mantenidos y tratados de acuerdo con los lineamientos establecidos por el *National Institute of Health* (NIH, EEUU) y los experimentos fueron aprobados por el Comité de ética animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL.

Todos los animales recibieron, en simultáneo y *ad libitum*, agua potable y alimento balanceado estéril (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) con 230 g Kg⁻¹ de proteína, 60 g Kg⁻¹ de fibra cruda, 100 g Kg⁻¹ de minerales totales, 13 g Kg⁻¹ de Ca, 8 g Kg⁻¹ de P, 120 g Kg⁻¹ de agua y vitaminas. Los ingredientes utilizados por el proveedor

para la formulación fueron: harina de maíz, trigo y soja, aceite de soja, gluten de maíz, aceite de girasol, harina de pescado, vitamina A, B1, B2, B6, B12, C, D3, K, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, ácido nicotínico, cloruro de colina, carbonato de calcio, cloruro de sodio, selenito de sodio yodato de calcio, óxido de cobre, sulfato ferroso, óxido manganeso, óxido de magnesio, óxido de zinc, lisina, metionina, treonina y extracto de romero. Los animales recibieron, vía intragástrica (*gavage*), cultivos de *L. gasseri* 70c, *L. plantarum* 73a y 73b, en las condiciones detalladas a continuación. Los cultivos fueron preparados diariamente, lavados 2 veces y resuspendidos en el volumen original con una solución de PBS estéril (pH 7,4). El grupo control recibió PBS estéril.

Capacidad protectora de las cepas *L. gasseri* 70c, *L. plantarum* 73a y 73b contra la infección por *Salmonella* Typhimurium

Para evaluar la capacidad protectora de las cepas ensayadas contra la infección de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium en ratones, se llevaron a cabo dos ensayos. El primer ensayo se diseñó con cuatro grupos de 12 animales cada uno: un grupo control y tres grupos que recibieron las cepas *L. gasseri* 70c, *L. plantarum* 73a o *L. plantarum* 73b, respectivamente. Los grupos tratados con las cepas recibieron vía intragástrica 0,2 mL de una suspensión que contenía 10^8 UFC mL⁻¹ durante 12 días consecutivos. En el día 11 del tratamiento los ratones fueron desafiados con una sola dosis de 10^6 UFC por ratón de *S. Typhimurium* 1724/12 cedida por Instituto Malbrán (Buenos Aires, Argentina). En el segundo ensayo, se establecieron dos grupos de 16 animales cada uno, un grupo control y el grupo tratado que recibió la cepa *L. plantarum* 73a durante 10 días consecutivos. En el día 11 del ensayo, se desafiaron los animales con una sola dosis de 10^6 UFC por ratón de *S. Typhimurium* 1724/12.

Para estos ensayos, se mantuvieron los animales en grupos de cuatro por jaula. Se monitoreó diariamente la sobrevida post-infección y se consideró el ensayo finalizado cuando no se registró ninguna muerte en ninguno de los grupos estudiados después de tres días consecutivos. Se graficó la mortalidad acumulada en el período post-infección *vs.* el tiempo y se expresaron los resultados como % de sobrevida frente la infección. El tamaño de las muestras se calculó según Charan y Kantharia (2013), teniendo en cuenta un nivel de significancia del 5 %, con una potencia del 80 % y una tasa de sobrevida del

40 % en el grupo control y del 90 % en los grupos tratados, dando como resultado un mínimo de 10 ratones por grupo.

Capacidad inmunomoduladora de *L. plantarum* 73a y *L. plantarum* 73b

En este ensayo se establecieron seis grupos de cinco animales cada uno: dos grupos control y cuatro grupos tratados con las cepas *L. plantarum* 73a o 73b, durante 3 o 10 días consecutivos. Cada uno de los animales del grupo tratado recibió vía intragástrica 10^8 UFC de las cepas *L. plantarum* 73a o 73b contenidas en 0,2 mL de PBS y el grupo control una solución de PBS estéril (pH 7,4). El día del sacrificio, los animales fueron anestesiados intraperitonealmente (0,2 mL por ratón) con una solución compuesta por 9 partes de ketamina (100 mg L^{-1}) + 9 partes de xilacina (20 mg L^{-1}) + 3 partes de acepromazina (10 mg L^{-1}) + 79 partes de solución salina estéril. Se removieron las porciones de intestino delgado y grueso y se colocaron inmediatamente en un baño de hielo. El intestino delgado fue lavado dos veces con 5 mL de una solución de PBS (pH 7,4) fría conteniendo 1 % (v/v) de un cóctel inhibidor de proteasas (P8340, Sigma, St. Louis, EEUU). Los fluidos intestinales así obtenidos se centrifugaron ($2000 \times g$, 30 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) y los sobrenadantes se conservaron a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ para la cuantificación de IgA-secretoria (IgA-S) mediante ELISA según Vinderola y col. (2007). Los intestinos delgados y grueso se congelaron a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Muestras de intestino de entre 100 y 200 mg se homogeneizaron (Ultra Turrax T8, Ika Labortechnik, Staufen, Alemania) en una solución de PBS (pH 7,4) con 1 % (v/v) del cóctel inhibidor de proteasas (P8340, Sigma, St. Louis, EEUU), 10 mmol L^{-1} de EDTA (Sigma, EEUU) y 0,05 % (v/v) de Tween 20 (Sigma, EEUU), en una relación de 1 mL de solución de PBS por cada 100 mg de tejido. Se centrifugaron las muestras homogenizadas ($9500 \times g$, 10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) y los sobrenadantes se conservaron a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ para la cuantificación de citoquinas. Se determinaron las concentraciones de TNF alfa (*Tumor Necrosis Factor* alfa), INF gamma, IL-6, -10 y -12 mediante ELISA utilizando kits comerciales (BD BiosciencesPharmingen, San Diego, EEUU) según las indicaciones del fabricante. Los resultados se expresaron en pg mL^{-1} de cada citoquina en el homogenato de tejido intestinal.

Las determinaciones de AGCC en heces se llevaron a cabo por HPLC en muestras recolectadas a los nueve días del tratamiento, solo para el grupo control y el grupo tratado con *L. plantarum* 73a, según Ferrario y col. (2014) con algunas modificaciones. El sistema cromatográfico consistió en una bomba cuaternaria, un desgasificador en línea, un inyector manual, un horno para control de temperatura de la columna y dos detectores en línea: UV y visible (210 nm) e índice de refracción (Perkin Elmer). Se utilizó una columna de "Aminex HPX-87H" (300 × 7,8 mm), un protector de columna Aminex Cation-H (30 × 4,6 mm) (Bio-Rad Laboratories) y un flujo isocrático de 0,6 mL min⁻¹, a una temperatura de 65 °C. Se realizó la identificación de las muestras con los detectores de UV e IR, teniendo en cuenta los tiempos de retención de las soluciones estándar (Sigma, EEUU). La cuantificación se realizó al mismo tiempo con el detector de índice de refracción. Cada muestra fue analizada por triplicado.

3.9 Fermentación de productos comerciales de base vegetal

Se obtuvieron cultivos en fase estacionaria (18 h) en caldo MRS de las cepas *L. plantarum* 73a y *L. rhamnosus* VTT E-97800 [179], se cosechó la biomasa por centrifugación (5000 × g, 15 min, 5 °C) y se realizaron tres lavados con una solución de PBS estéril (pH 7,4). El pellet se resuspendió en 100 mL de los productos comerciales utilizados, en una concentración final de 10⁶ UFC mL⁻¹ y se incubaron a 30 °C por 24 h. Los productos comerciales utilizados fueron: bebida a base de avena (Valio®), jugo de manzana (Valio®) y *shot* de frutilla-zanahoria-manzana (Valio®) (S4). Todos los productos alimenticios utilizados fueron catalogados como "orgánicos", según las indicaciones del fabricante, garantizando su calidad por las autoridades competentes correspondientes. Las fermentaciones se realizaron por triplicado. Como control negativo, se incubaron los productos sin inocular bajo las mismas condiciones. Antes y después de la fermentación, se realizaron recuentos celulares en agar MRS y se midió de pH de los productos. Además, se determinó la estabilidad en el tiempo de los productos fermentados mediante recuentos en agar MRS (UFC mL⁻¹) y mediciones de pH después de cuatro días de almacenamiento a 5 °C.

3.10 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos fueron presentados como la media y la desviación estándar de las réplicas y fueron analizados mediante el *software* SPSS (SPSS Inc., Chicago, EEUU). En todos los ensayos, se consideraron significativas las diferencias cuando el valor de $p < 0,05$. Además, se evaluó la normalidad (distribución paramétrica o normal) de los datos mediante la prueba de normalidad de Ryan-Joiner.

Se emplearon la prueba T de *student* para datos paramétricos o la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos para analizar las diferencias de los recuentos (\log_{10} UFC mL⁻¹), antes y después del proceso de liofilización. Las diferencias, entre los recuentos antes y después del almacenamiento acelerado (37 °C, 1 mes) o a largo plazo (5 ° y 22 °C, 12 meses), se evaluaron mediante un análisis de ANOVA post hoc con la prueba de Dunnett (datos paramétricos) o Kruskal-Wallis (datos no paramétricos). Con el fin de evaluar la relación entre la viabilidad en el almacenamiento acelerado y a largo plazo, se empleó el *software* Minitab 18 (Minitab Inc., EEUU) para el análisis de las regresiones correspondientes.

Para analizar los resultados obtenidos del análisis de superficie [180] se empleó el *software* R [181] con los paquetes de datos rsm y lme4 [182]. El modelo permitió evaluar los efectos de términos lineales, cuadráticos e interacción de las variables independientes y las variables dependientes. Para seleccionar el modelo que mejor se ajustó, se verificó la bondad del modelo mediante un análisis de la varianza (ANOVA). La calidad del modelo ajustado se examinó mediante el coeficiente de determinación R cuadrado. El término error fue definido como $\alpha = 0,05$.

El crecimiento, estabilidad en el tiempo (\log_{10} UFC mL⁻¹) y pH de los productos fermentados con las cepas *L. plantarum* 73a y *L. rhamnosus* VTT E-97800, se analizaron mediante la prueba T para muestras dependientes. En cambio, la prueba T para muestras independientes se empleó para comparar el número células viables (\log_{10} UFC mL⁻¹) de la misma matriz alimenticia, pero fermentadas con las cepas *L. plantarum* 73a o *L. rhamnosus* VTT E-97800, luego de la fermentación y después de cuatro días de

almacenamiento de los mismos. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

La sobrevida frente a la infección por *Salmonella* fue analizada mediante la prueba de igualdad, *Log Rank* (Mantel-cox). Se aplicó el análisis de ANOVA post hoc Dunnett o Kruskal-Wallis para analizar las determinaciones de citoquinas en cultivos celulares, en homogenatos de intestino delgado y grueso y en fluido intestinal para IgA-S. Las diferencias significativas en las concentraciones de AGCC fueron analizadas mediante la prueba T de *student* para datos paramétricos o la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos.

4. Resultados

4.1 Aislamiento, identificación y diversidad genética de las cepas aisladas

Con el objetivo de aislar microorganismos de leche materna, con foco en el grupo de los lactobacilos, se sembraron, en superficie de agar MRS, 164 muestras de leche materna. La mayoría de las colonias presentaron morfología cocoide (observación al microscopio, contraste de fases 1000×) y una concentración entre 1 a 5 log₁₀ UFC mL⁻¹. Se obtuvieron un total de 14 presuntos lactobacilos y una presunta cepa de bifidobacteria a partir de 10 madres diferentes (Tabla 4), las cuales estaban presentes en las muestras en un rango de concentración entre 1,0 a 4,9 log₁₀ UFC mL⁻¹. Se identificaron por MALDI-TOF y secuenciación parcial del gen 16S ARNr, las siguientes especies: *L. plantarum* (8 aislados), *L. gasseri* (2), *L. fermentum* (2), *L. rhamnosus* (1), *Lactobacillus gallinarum* (1) y *B. animalis* subsp. *lactis* (1).

La diversidad genética de los aislamientos se evaluó mediante el análisis de las RAPD-PCR. En este sentido, el primer cebador, M13, permitió discriminar entre las cepas *L. gasseri* 70a y 70c, obtenidas de la misma madre y con un porcentaje de similitud menor al 85 % (Fig. 7). En cambio, los cebadores B10 y 1254 no fueron efectivos para diferenciar los aislamientos. A pesar de que no se observaron diferencias entre las cepas *L. plantarum* 73a y *L. plantarum* 73b, estas presentaron un comportamiento diferenciado en los medios modificados de MRS (Cap. 2, Sec. 3.7). Los aislamientos identificados como *L. fermentum*, 94r y 94i, presentaron colonias de morfología diferente, por lo que se considera que podrían ser cepas diferentes de la misma madre.

Tabla 4. Identidad mediante MALDI-TOF y secuenciación parcial de gen 16S ARNr e hidrofobicidad de las cepas aisladas de leche materna.

Cepa	Identidad		Hidrofobicidad (%)	
	MALDI-TOF	Secuenciación del gen 16S ARNr	Hexano	Xileno
18	<i>L. plantarum/pentosus</i>	<i>L. plantarum</i>	Nd	18,2 ± 7,6
39a	<i>L. plantarum/pentosus</i>	<i>L. plantarum</i>	Nd	11,1 ± 4,3
39e	<i>L. plantarum/pentosus</i>	<i>L. plantarum</i>	Nd	10,8 ± 1,3
41	<i>L. plantarum/pentosus</i>	<i>L. plantarum</i>	11,2 ± 0,4	13,9 ± 7,0
42	<i>L. plantarum/pentosus</i>	<i>L. plantarum</i>	Nd	7,8 ± 1,7
70a	<i>L. gasseri/acidophilus</i>	<i>L. gasseri</i>	89,5 ± 0,4	91,0 ± 2,9
70c	<i>L. gasseri/acidophilus</i>	<i>L. gasseri</i>	93,1 ± 3,1	87,1 ± 8,5
73a	<i>L. spp.</i>	<i>L. plantarum</i>	Nd	10,6 ± 2,0
73b	<i>L. spp.</i>	<i>L. plantarum</i>	Nd	7,4 ± 2,7
82	<i>L. plantarum/pentosus</i>	<i>L. plantarum</i>	Nd	9,0 ± 3,0
85	Nd	<i>B. animalis subsp. lactis</i>	Nd	95,9 ± 3,2
94r	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	Nd	91,9 ± 2,5
94i	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	Nd	94,9 ± 1,7
94d	Nd	<i>L. gallinarum</i>	Nd	90,1 ± 0,9
97	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	Nd	12,8 ± 3,8

Nd: no determinado. *L.*: *Lactobacillus* considerando la denominación anterior, *B.*: *Bifidobacterium*.

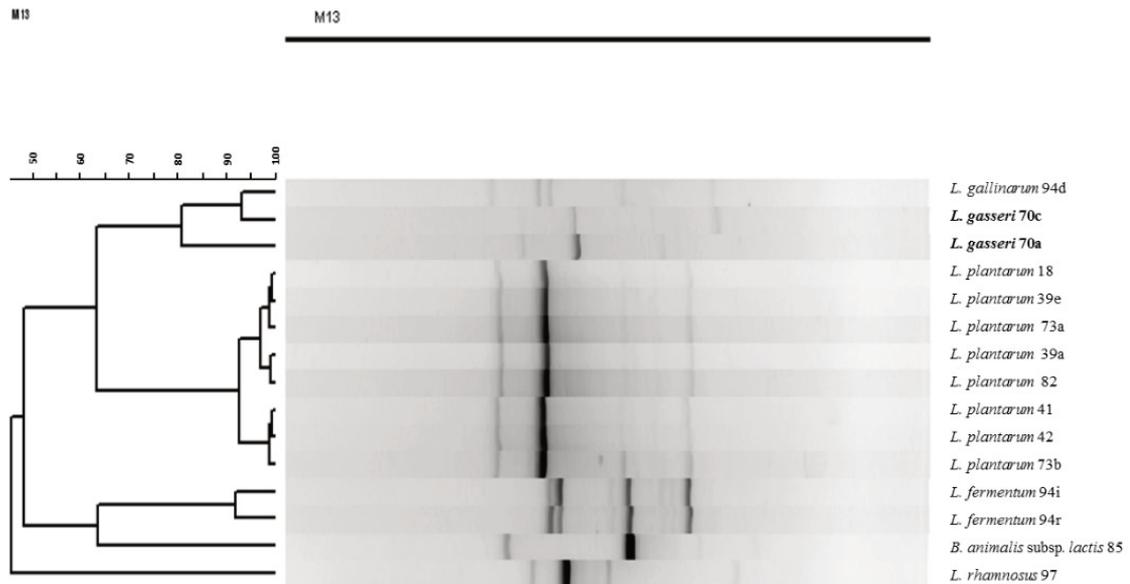


Figura 7. Dendrograma obtenido empleando el *software* “BioNumeric 6.1” (Bélgica) y el método de agrupamiento UPGMA (siglas en inglés de *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*). *L.*: *Lactobacillus*, *B.*: *Bifidobacterium*. Se indican en negrita las cepas de *L. gasseri* diferenciadas con menos del 85 % de similitud.

4.2 Potencial probiótico de las cepas aisladas de leche materna

Los compuestos hidrocarbonados más utilizados en los ensayos de hidrofobicidad son n-hexano, p-xileno y tolueno y, en la mayoría de los casos, la elección de uno u otro parecería no afectar los resultados obtenidos [183,184]. La misma tendencia se observó en nuestro estudio al determinar la hidrofobicidad frente a xileno y hexano de las cepas aisladas (Tabla 4). Los valores de hidrofobicidad obtenidos oscilaron entre 5 y 96 %. Las cepas de *L. plantarum* presentaron los valores de hidrofobicidad más bajos, por el contrario, las cepas *L. gasseri*, 70a y 70c, *B. animalis* subsp. *lactis* 85, *L. fermentum*, 94r y 94i y *L. gallinarum* 94d presentaron valores del 80 al 95 %.

Por otro lado, se determinó la potencial capacidad antiinflamatoria de los aislamientos mediante co-cultivos de macrófagos murinos con las cepas aisladas,

observándose la máxima inducción en la producción de IL-10 para *L. gasseri* 70a, *L. gasseri* 70c, *L. plantarum* 73a y *L. plantarum* 73b (Fig. 8).

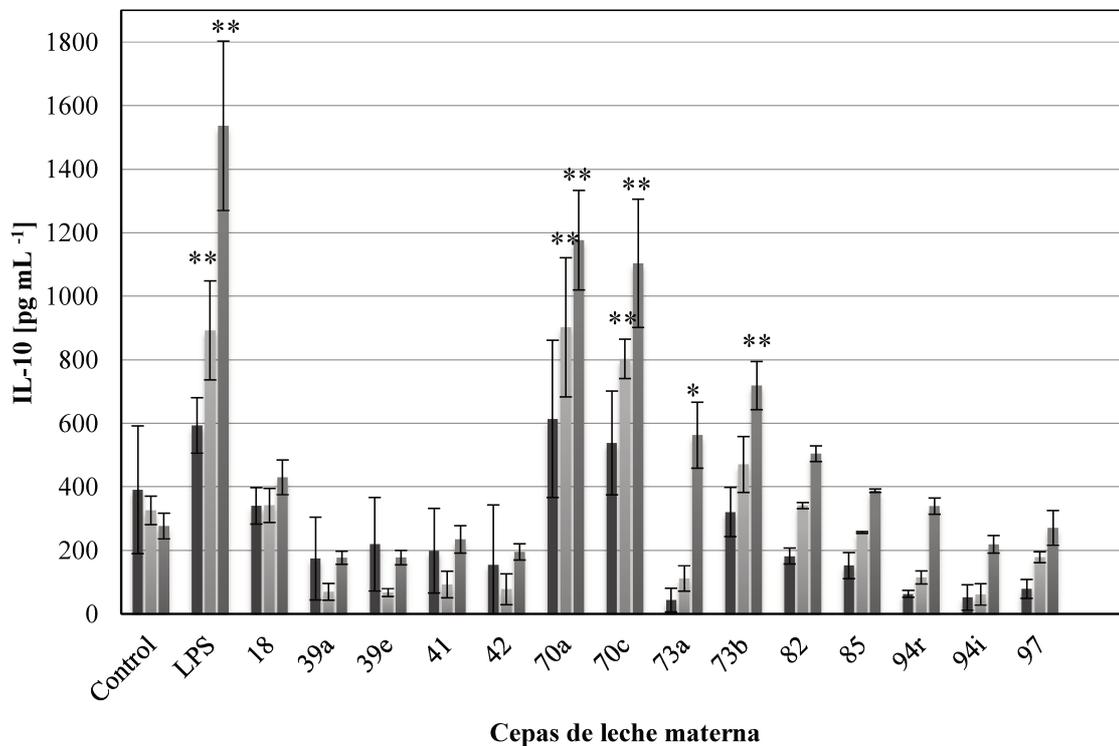


Figura 8. Producción de IL-10 [pg mL⁻¹] en el sobrenadante de co-cultivos de macrófagos murinos con las cepas aisladas de leche materna, luego de 4 (■), 6 (▒) o 8 (□) h de incubación. Como control de activación se utilizó LPS (0,1 µg mL⁻¹) y en el control solo se incubaron macrófagos no estimulados. Las diferencias significativas se observaron, en comparación con el control (**, p < 0,0001 y *, p < 0,009) mediante el análisis de ANOVA post hoc la prueba de Dunnett. LPS: lipopolisacárido.

4.3 Resistencia a la liofilización y al almacenamiento

Antes del proceso de liofilización, los niveles de células viables de las suspensiones de las cepas oscilaron entre $9,11 \pm 0,05$ y $10,67 \pm 0,10 \log_{10}$ UFC mL⁻¹ (Tabla 5). Inmediatamente después del proceso de liofilización, las cepas *L. plantarum* 41, *L. gasseri* 70a, *L. fermentum* (94r y 94i) y *L. rhamnosus* 97 presentaron una pérdida significativa de la viabilidad celular en ambos protectores. En particular, la cepa

L. gallinarum 94d presentó una sobrevida menor a $1 \log_{10}$ UFC mL^{-1} luego de la liofilización, por lo tanto, no fue considerada para estudios posteriores. Además, se observaron disminuciones significativas cuando se empleó PDX como protector para *L. plantarum* (cepas 39a, 73a y 82), *L. gasseri* 70c y cuando se utilizó L para *L. plantarum* 18 y 39e. Es importante destacar que las cepas *L. plantarum* 42 y 73a, así como también *B. animalis* subsp. *lactis* 85 no fueron afectadas por el proceso de liofilización, independientemente del protector utilizado. En cambio, se observó la máxima reducción en los niveles de células viables para *L. rhamnosus* 97 utilizando PDX ($1,59 \log_{10}$ UFC mL^{-1}), mientras que cuando se empleó L como protector, la muerte celular de *L. plantarum* 42 no fue significativa. La a_w de los cultivos liofilizados (Tabla 5) fue menor al valor máximo ($< 0,20$), generalmente recomendado para conservar la viabilidad durante almacenamientos prolongados [185].

Tabla 5. Sobrevida de las cepas aisladas de leche materna al proceso de liofilización en 10 % (p/v) de lactosa (L) o 10 % (p/v) povidextrona (PDX) y actividad acuosa (a_w) de los cultivos deshidratados obtenidos.

Cepa	Protector	Recuentos celulares		Δ^1	p	a_w
		\log_{10} UFC mL ⁻¹				
		Antes de la liofilización	Después de la liofilización			
<i>L. plantarum</i> 18	L	9,97 ± 0,03	9,44 ± 0,02	0,53	0,000 ²	0,124 ± 0,007
	P	10,44 ± 0,32	9,51 ± 0,28	0,92	0,095 ²	0,088 ± 0,019
<i>L. plantarum</i> 39a	L	10,41 ± 0,08	10,28 ± 0,05	0,14	0,167 ²	0,065 ± 0,011
	P	10,46 ± 0,05	10,20 ± 0,05	0,26	0,004 ²	0,088 ± 0,019
<i>L. plantarum</i> 39e	L	10,67 ± 0,10	10,10 ± 0,05	0,57	0,000 ²	0,096 ± 0,003
	P	10,32 ± 0,07	10,17 ± 0,09	0,15	0,251 ²	0,083 ± 0,011
<i>L. plantarum</i> 41	L	9,23 ± 0,06	8,83 ± 0,07	0,40	0,001 ²	0,123 ± 0,015
	P	9,11 ± 0,05	8,88 ± 0,05	0,23	0,009 ²	0,074 ± 0,008
<i>L. plantarum</i> 42	L	9,40 ± 0,13	9,38 ± 0,11	0,02	0,923 ²	0,129 ± 0,035
	P	9,47 ± 0,18	9,22 ± 0,05	0,26	0,180 ³	0,068 ± 0,008
<i>L. gasseri</i> 70a	L	10,10 ± 0,09	9,57 ± 0,07	0,53	0,000 ²	0,104 ± 0,012
	P	10,09 ± 0,09	9,69 ± 0,08	0,40	0,003 ³	0,110 ± 0,010
<i>L. gasseri</i> 70c	L	9,65 ± 0,24	9,44 ± 0,11	0,22	0,438 ²	0,136 ± 0,021
	P	9,96 ± 0,04	9,45 ± 0,09	0,51	0,002 ³	0,133 ± 0,025
<i>L. plantarum</i> 73a	L	10,48 ± 0,08	10,30 ± 0,11	0,18	0,183 ²	0,128 ± 0,041
	P	10,32 ± 0,05	10,26 ± 0,06	0,06	0,508 ²	0,083 ± 0,003
<i>L. plantarum</i> 73b	L	10,25 ± 0,07	10,33 ± 0,06	-0,08	0,470 ²	0,109 ± 0,009
	P	10,11 ± 0,06	10,33 ± 0,04	-0,22	0,025 ²	0,098 ± 0,009
<i>L. plantarum</i> 82	L	10,40 ± 0,07	10,22 ± 0,06	0,18	0,074 ²	0,111 ± 0,006
	P	10,55 ± 0,05	10,30 ± 0,08	0,26	0,021 ²	0,081 ± 0,009
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> 85	L	10,39 ± 0,39	10,12 ± 0,14	0,27	1,000 ³	0,120 ± 0,005
	P	9,83 ± 0,15	9,89 ± 0,12	-0,06	0,789 ²	0,108 ± 0,017
<i>L. fermentum</i> 94r	L	10,13 ± 0,07	8,74 ± 0,21	1,39	0,001 ³	0,111 ± 0,003
	P	10,28 ± 0,10	9,67 ± 0,03	0,61	0,004 ³	0,100 ± 0,008
<i>L. fermentum</i> 94i	L	9,83 ± 0,05	9,38 ± 0,14	0,45	0,009 ²	0,126 ± 0,006
	P	10,14 ± 0,21	9,44 ± 0,03	0,70	0,020 ³	0,099 ± 0,007

<i>L. rhamnosus</i> 97	L	10,39 ± 0,09	9,57 ± 0,25	0,83	0,020 ²	0,125 ± 0,005
	P	10,31 ± 0,08	8,73 ± 0,29	1,59	0,008 ³	0,085 ± 0,003

L.: *Lactobacillus*, B.: *Bifidobacterium*.

¹Δ: diferencias entre los recuentos celulares de los cultivos antes y después del proceso de liofilización. Los liofilizados se reconstituyeron en el volumen original antes de realizar las diluciones seriadas y se sembraron en agar MRS. Los resultados se expresaron en log₁₀ UFC mL⁻¹.

La prueba T² o Mann-Whitney U³ se realizaron según la distribución de los datos y la diferencia se consideró significativa para p < 0,05.

Luego del proceso de liofilización, los cultivos concentrados fueron cerrados al vacío y almacenados a 37 °C por 4 semanas (ensayo de almacenamiento acelerado) y a 5 o 25 °C por 12 meses (ensayo de almacenamiento estándar a largo plazo). La mayoría de las cepas evaluadas presentaron una pérdida significativa de viabilidad celular durante el almacenamiento acelerado. Sin embargo, algunas cepas fueron levemente afectadas, tal fue el caso de *L. plantarum* 42 en ambos protectores, *L. plantarum* 73a, *B. animalis* subsp. *lactis* 85, *L. plantarum* 94r y *L. rhamnosus* 97 con L o *L. plantarum* 18 y 82 con P (Tabla 6). Las reducciones de la viabilidad celular, luego del almacenamiento acelerado, fueron entre 0,3 a 6,3 log₁₀ UFC g⁻¹ según la cepa y el crioprotector empleado. A 25 °C, la pérdida de viabilidad fue significativa en la mayoría de las cepas ensayadas, excepto para *L. plantarum* 18 con ambos crioprotectores y *L. rhamnosus* 97 en L. En el almacenamiento prolongado a 5 °C, no se observaron diferencias significativas en la mayoría de los cultivos estudiados, al menos con uno de los protectores utilizados. La excepción fue la cepa *L. plantarum* 39a, con una pérdida de viabilidad celular de 0,61 log₁₀ UFC g⁻¹ en L y 0,39 log₁₀ UFC g⁻¹ en P. Cuando se comparó la muerte celular de los liofilizados luego del almacenamiento acelerado *versus* el almacenamiento a largo plazo a distintas temperaturas, se observó una mejor correlación para la L (R² = 0,764) que para PDX (R² = 0,621) (Fig. 9).

Tabla 6. Sobrevida de las cepas liofilizadas durante el almacenamiento acelerado (37 °C, 4 semanas) o a largo plazo (5 y 25 °C, 12 meses), en lactosa (L) o povidexrosa (PDX) al 10 % (p/v).

Cepa	Protector	Temperatura	Recuentos celulares		Δ^1	p
			Inicial	Final		
<i>L. plantarum</i> 18	L	37 °C		8,37 ± 0,12	-2,07	0,008 ³
		5 °C	10,44 ± 0,02	9,67 ± 0,08	-0,77	0,287 ³
		25 °C		9,28 ± 0,11	-1,15	1,000 ³
	P	37 °C		9,58 ± 0,08	-0,93	0,064 ³
		5 °C	10,51 ± 0,28	9,86 ± 0,23	-0,65	0,307 ³
		25 °C		9,43 ± 0,16	-1,08	1,000 ³
<i>L. plantarum</i> 39a	L	37 °C		9,10 ± 0,05	-2,18	0,000 ²
		5 °C	11,28 ± 0,05	10,66 ± 0,08	-0,61	0,000 ²
		25 °C		8,76 ± 0,04	-2,52	0,000 ²
	P	37 °C		10,09 ± 0,03	-1,10	0,000 ²
		5 °C	11,20 ± 0,05	10,81 ± 0,07	-0,39	0,001 ²
		25 °C		9,67 ± 0,08	-1,53	0,000 ²
<i>L. plantarum</i> 39e	L	37 °C		10,15 ± 0,03	-0,96	0,024 ³
		5 °C	11,10 ± 0,05	10,84 ± 0,07	-0,27	1,000 ³
		25 °C		10,06 ± 0,08	-1,04	0,000 ³
	P	37 °C		10,14 ± 0,02	-1,04	0,009 ³
		5 °C	11,17 ± 0,09	10,67 ± 0,08	-0,50	0,201 ³
		25 °C		9,89 ± 0,17	-1,28	0,000 ³
<i>L. plantarum</i> 41	L	37 °C		8,11 ± 0,07	-1,72	0,000 ³
		5 °C	9,83 ± 0,07	9,52 ± 0,04	-0,32	0,909 ³
		25 °C		9,14 ± 0,14	-0,70	0,046 ³
	P	37 °C		8,22 ± 0,03	-1,66	0,010 ³
		5 °C	9,88 ± 0,05	9,57 ± 0,04	-0,32	0,636 ³
		25 °C		8,65 ± 0,12	-1,24	0,000 ³

		37 °C		9,96 ± 0,05	-0,42	0,523 ³
	L	5 °C	10,38 ± 0,11	10,09 ± 0,09	-0,29	1,000 ³
		25 °C		9,55 ± 0,05	-0,82	0,000 ³
<i>L. plantarum</i> 42		37 °C		9,84 ± 0,09	-0,38	0,505 ³
	P	5 °C	10,22 ± 0,05	10,01 ± 0,08	-0,20	1,000 ³
		25 °C		9,44 ± 0,02	-0,78	0,000 ³
		37 °C		4,25 ± 0,15	-6,32	0,002 ³
	L	5 °C	10,57 ± 0,07	8,44 ± 0,46	-2,14	0,728 ³
		25 °C		4,46 ± 0,12	-6,11	0,000 ³
<i>L. gasseri</i> 70a		37 °C		5,14 ± 0,15	-5,56	0,002 ³
	P	5 °C	10,69 ± 0,08	9,57 ± 0,17	-1,12	0,728 ³
		25 °C		5,46 ± 0,11	-5,24	0,000 ³
		37 °C		5,02 ± 0,22	-5,41	0,005 ³
	L	5 °C	10,44 ± 0,11	9,48 ± 0,13	-0,96	0,842 ³
		25 °C		4,81 ± 0,28	-5,62	0,000 ³
<i>L. gasseri</i> 70c		37 °C		6,19 ± 0,07	-4,27	0,000 ²
	P	5 °C	10,45 ± 0,009	9,53 ± 0,07	-0,92	0,000 ²
		25 °C		5,75 ± 0,10	-4,70	0,000 ²
		37 °C		9,21 ± 0,06	-2,10	0,066 ³
	L	5 °C	11,30 ± 0,11	11,00 ± 0,04	-0,30	0,745 ³
		25 °C		8,33 ± 0,09	-2,97	0,000 ³
<i>L. plantarum</i> 73a		37 °C		9,33 ± 0,08	-1,93	0,000 ²
	P	5 °C	11,26 ± 0,06	10,87 ± 0,04	-0,39	0,000 ²
		25 °C		8,39 ± 0,05	-2,87	0,000 ²
		37 °C		10,99 ± 0,08	-0,34	0,002 ³
	L	5 °C	11,33 ± 0,06	10,10 ± 0,17	-1,23	1,000 ³
		25 °C		10,13 ± 0,12	-1,20	0,010 ³
<i>L. plantarum</i> 73b		37 °C		11,02 ± 0,18	-0,31	0,003 ³
	P	5 °C	11,33 ± 0,04	10,20 ± 0,06	-1,13	1,000 ³
		25 °C		10,28 ± 0,09	-1,04	0,001 ³

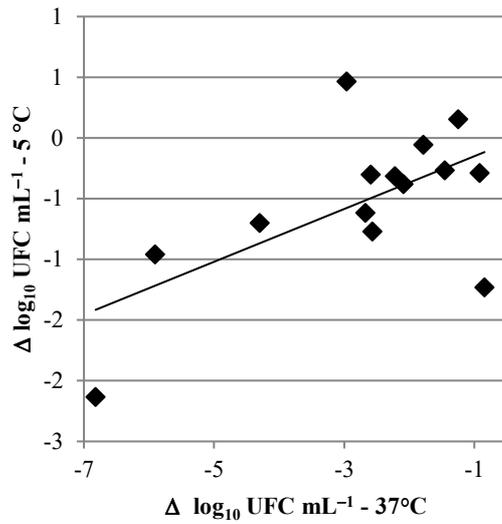
		37 °C		9,93 ± 0,04	-1,29	0,000 ²
	L	5 °C	11,22 ± 0,06	11,16 ± 0,04	-0,06	0,329 ²
		25 °C		9,65 ± 0,04	-1,58	0,000 ²
<i>L. plantarum</i> 82		37 °C		9,90 ± 0,06	-1,40	0,070 ³
	P	5 °C	11,30 ± 0,08	10,89 ± 0,13	-0,41	1,000 ³
		25 °C		9,65 ± 0,05	-1,65	0,000 ³
		37 °C		9,53 ± 0,04	-1,59	0,067 ³
	L	5 °C	11,12 ± 0,14	10,74 ± 0,06	-0,38	1,000 ³
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> 85		25 °C		8,20 ± 0,06	-2,91	0,000 ³
		37 °C		8,32 ± 0,18	-2,57	0,000 ²
	P	5 °C	10,89 ± 0,12	10,59 ± 0,04	-0,30	0,137 ²
		25 °C		6,04 ± 0,10	-4,85	0,000 ²
		37 °C		8,99 ± 0,09	-0,75	0,666 ³
	L	5 °C	9,74 ± 0,21	9,89 ± 0,05	0,15	1,000 ³
		25 °C		7,84 ± 0,45	-1,89	0,003 ³
<i>L. fermentum</i> 94r		37 °C		8,19 ± 0,32	-2,48	0,000 ³
	P	5 °C	10,67 ± 0,03	10,11 ± 0,06	-0,57	1,000 ³
		25 °C		8,76 ± 0,06	-1,91	0,004 ³
		37 °C		6,58 ± 0,26	-3,80	0,000 ²
	L	5 °C	10,38 ± 0,14	9,68 ± 0,09	-0,70	0,000 ²
		25 °C		8,13 ± 0,07	-2,25	0,000 ²
<i>L. fermentum</i> 94i		37 °C		8,33 ± 0,04	-2,11	0,006 ³
	P	5 °C	10,44 ± 0,03	9,24 ± 0,08	-1,20	0,368 ³
		25 °C		8,94 ± 0,13	-1,50	0,007 ³
		37 °C		8,10 ± 0,03	-2,46	0,085 ³
	L	5 °C	10,57 ± 0,25	11,03 ± 0,06	0,47	1,000 ³
		25 °C		8,19 ± 0,04	-2,37	0,346 ³
<i>L. rhamnosus</i> 97		37 °C		3,95 ± 0,04	-5,78	0,000 ²
	P	5 °C	9,73 ± 0,29	10,68 ± 0,06	0,96	1,000 ²
		25 °C		6,46 ± 0,14	-3,27	0,000 ²

¹Δ: diferencias entre los recuentos celulares correspondientes a los liofilizados antes y después del almacenamiento. Los liofilizados se reconstituyeron en el volumen original antes de realizar las diluciones seriadas y se sembraron en agar MRS. Los resultados se expresaron en \log_{10} UFC mL⁻¹.

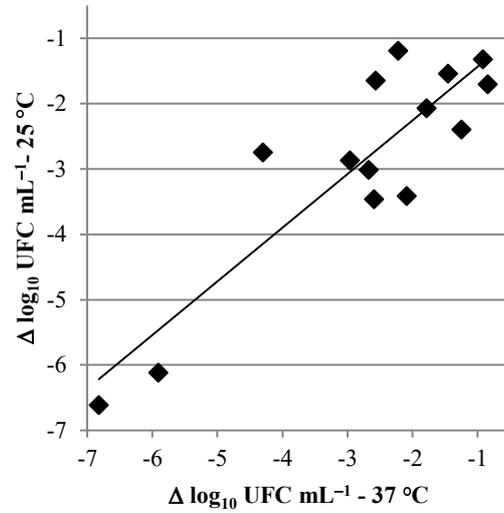
Se realizó un análisis de ANOVA post hoc Dunnett ² para datos paramétricos o Kruskal–Wallis ³ para datos no paramétricos y las diferencias se consideraron significativas para $p < 0,05$.

L.: *Lactobacillus*, *B.:* *Bifidobacterium*.

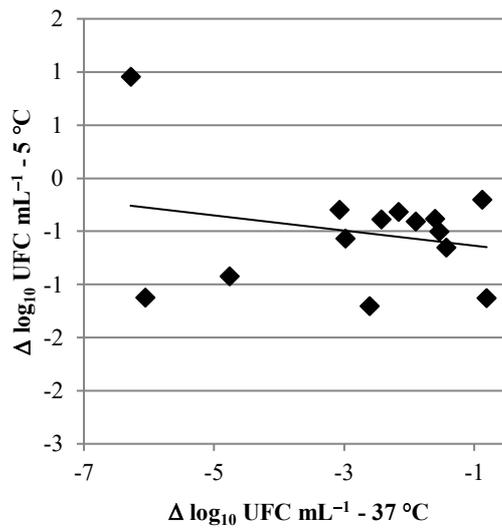
8 a.



b.



c.



d.

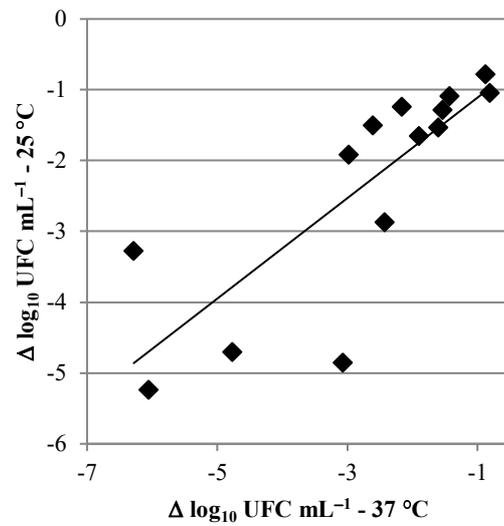


Figura 9. Correlación entre la muerte celular luego del almacenamiento a largo plazo (5 °C o 25 °C, 12 meses) con la muerte celular luego del almacenamiento acelerado (37 °C, 4 semanas), usando como protectores lactosa (a y b) o povidextrosa (c y d). Los coeficientes de la regresión lineal fueron: a. $R^2=0,321$, b. $R^2=0,764$, c. $R^2=0,000$ y d. $R^2=0,621$.

4.4 Reformulación de un medio de cultivo para una producción costo-efectiva de biomasa

Considerando que las fuentes de nitrógeno utilizadas en la formulación de medios de cultivo para lactobacilos, como la pluripectona y el extracto de levadura, son los ingredientes que pueden representar entre el 60 y el 70% del costo del medio de cultivo, se llevó a cabo un diseño experimental 2^2 factorial para hacer que la formulación sea costo-efectiva (Fig. 10). Teniendo en cuenta la producción de IL-10 en los co-cultivos con macrófagos (Cap. 2, Sec. 3.5.), se seleccionaron las cepas *L. gasseri* 70c y *L. plantarum* 73a y 73b para esta parte del estudio. A pesar de que *L. gasseri* 70a también favoreció la liberación de IL-10 en el ensayo con líneas celulares, solo *L. gasseri* 70c fue seleccionada porque presentó una mejor viabilidad post liofilización en L (Cap. 2, Sec. 3.6, Tabla 5).

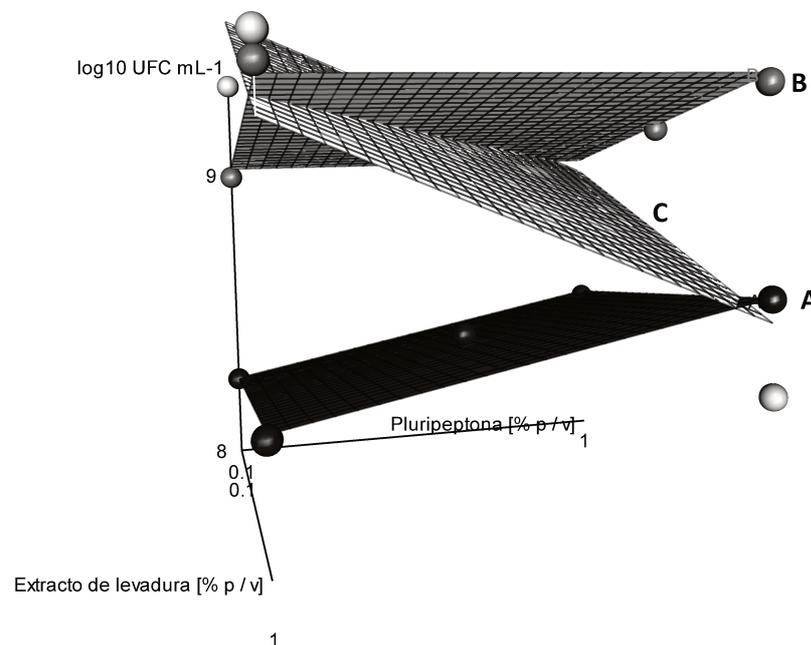


Figura 10. Gráfico 3D de superficie de respuesta: recuentos celulares (\log_{10} UFC mL⁻¹) de las cepas *L. gasseri* 70c (A), *L. plantarum* 73b (B) y 73a (C) vs. las concentraciones de extracto de levadura y pluripectona [% p/v].

El análisis de ANOVA determinó que los efectos cuadráticos del extracto de levadura y la pluripeptona no fueron estadísticamente significativos, así como tampoco la interacción entre ellos ($p > 0,05$), por lo tanto, se eliminaron del modelo. Finalmente, el modelo ajustado con un valor de $p = 0,007$ y un ajuste de $R^2 = 0,83$ fue:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \gamma_1 z_1 + \gamma_2 z_2 + \delta_{11} x_1 z_1 + \delta_{12} x_2 z_1 + \delta_{21} x_1 z_2 + \delta_{22} x_2 z_2 + \epsilon$$

El valor de $R^2 = 0,83$ indica que el modelo es capaz de explicar el 83 % de los resultados para las cepas ensayadas. Además, el comportamiento de las cepas fue diferente dependiendo de la variable cuantitativa considerada: extracto de levadura o pluripeptona. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el modelo con las variables elegidas se relacionó con la respuesta mediante la siguiente ecuación, según los coeficientes descritos en la Tabla 7.

$$\log_{10} \text{ UFC mL}^{-1} (L. \textit{gasseri} 70c) = 8,2264 + 0,0889 * x_1 + 0,2777 * x_2$$

$$\log_{10} \text{ UFC mL}^{-1} (L. \textit{plantarum} 73b) = 8,9908 + 0,1778 * x_1 + 0,0148 * x_2$$

$$\log_{10} \text{ UFC mL}^{-1} (L. \textit{plantarum} 73a) = 9,6368 - 0,5037 * x_1 - 0,6056 * x_2$$

El incremento de extracto de levadura y pluripeptona impactó positivamente en la cantidad de biomasa producida de las cepas *L. gasseri* 70c y *L. plantarum* 73b, aunque de forma diferente según el ingrediente considerado. El efecto de la pluripeptona fue mayor para *L. gasseri* 70c, mientras que para *L. plantarum* 73b lo fue el extracto de levadura. Por el contrario, el incremento de los componentes seleccionados pareció afectar negativamente el desarrollo de *L. plantarum* 73a.

Tabla 7. Coeficientes del modelo a partir del análisis de la varianza (ANOVA).

Coefficiente	Valor estimado	SD	Valor t	Pr(> t)
β_0	9,64	0,15	65,12	0,00***
β_1	-0,50	0,17	-2,99	0,02**
β_2	-0,60	0,19	-3,28	0,02**
γ_1	-1,41	0,22	-6,43	0,00***
γ_2	-0,65	0,22	-2,90	0,03**
δ_{11}	0,59	0,25	2,37	0,06
δ_{21}	0,68	0,25	2,72	0,03**
δ_{12}	0,88	0,26	3,38	0,01**
δ_{22}	0,62	0,25	2,48	0,05**

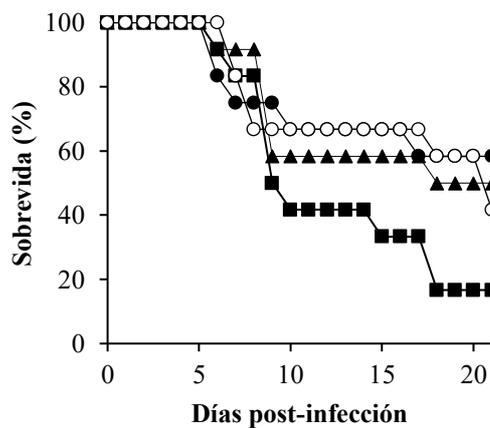
*** $p < 0,000$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

4.5 Ensayos *in vivo*

Para el primer ensayo *in vivo* de prevención contra infecciones entéricas por *S. Typhimurium*, se seleccionaron las cepas *L. gasseri* 70c, *L. plantarum*, 73a y 73b, ya que fueron las que presentaron una mayor inducción de IL-10 en los co-cultivos con macrófagos (Cap. 2, Sec. 3.5). Teniendo en cuenta el principio de las 3Rs (Reducción, Reemplazo y Refinamiento) en animales de experimentación [186], *L. gasseri* 70a no fue considerada con el objeto de reducir la cantidad de animales necesarios. A pesar de que *L. gasseri* 70a favoreció la liberación de IL-10 en los cultivos celulares, esta cepa no presentó diferencias tecnológicas con *L. gasseri* 70c (Cap.2, Sec. 3.6), además de ser aislada de la misma madre. En el primer ensayo, la sobrevivencia del grupo control fue del 42 %, mientras que la sobrevivencia de los animales que recibieron lactobacilos fue de 58,3 % para *L. plantarum* 73a, 50,0 % para *L. plantarum* 73b y 16,7 % para *L. gasseri* 70c (Fig. 11). Sin embargo, los grupos tratados no presentaron diferencias significativas respecto al grupo control. Considerando el mayor % de sobrevivencia observado para *L. plantarum* 73a como un posible indicador de un efecto benéfico no detectado de forma significativa, se repitió el ensayo con un número mayor de animales por grupo, incrementando el N de

12 a 16 ratones, con el objetivo de incrementar el poder estadístico del ensayo [176]. En el segundo ensayo *in vivo* (Fig. 11), la sobrevivencia de los animales que recibieron *L. plantarum* 73a fue significativamente mayor (80,3 %, $p = 0,004$), en comparación, con la del grupo control (25 %).

11.a.



b.

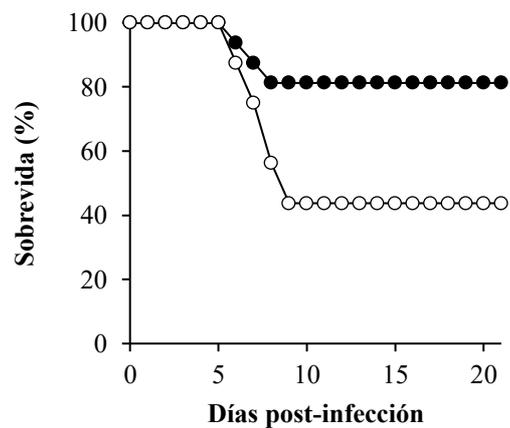


Figura 11. Sobrevivencia (%) de ratones BALB/c frente a la infección por *Salmonella* serotipo Typhimurium del grupo control (○) o del grupo que recibió *L. gasseri* 70c (■), *L. plantarum* 73a (●) o 73b (▲). **a:** 1^{er} ensayo, **b:** 2^{do} ensayo. Los animales del grupo control recibieron PBS estéril.

En un tercer ensayo *in vivo*, los animales recibieron las cepas *L. plantarum* 73a y 73b durante 3 o 10 días consecutivos. Se determinó IgA-S en el fluido intestinal de cada grupo estudiado. Los niveles de citoquinas se determinaron mediante ELISA en homogenados de intestino delgado y grueso. La concentración de IgA-S se incrementó significativamente ($p = 0,001$) cuando los animales recibieron la cepa *L. plantarum* 73a ($11,74 \pm 0,54 \mu\text{g mL}^{-1}$), en comparación, con el grupo control ($8,40 \pm 0,41 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Fig. 12). En general, cuando se evaluó la capacidad inmunomoduladora de las cepas, *L. plantarum* 73a presentó un efecto inmunomodulador mayor que *L. plantarum* 73b considerando la expresión de citoquinas. La administración de *L. plantarum* 73a incrementó la mayoría de las citoquinas evaluadas a excepción de la IL-12 en el intestino

delgado y TNF alfa en el intestino grueso. En cambio, *L. plantarum* 73b reguló las citoquinas IL-10 y TNF alfa, principalmente en intestino grueso luego de 10 días de administración (Fig. 13).

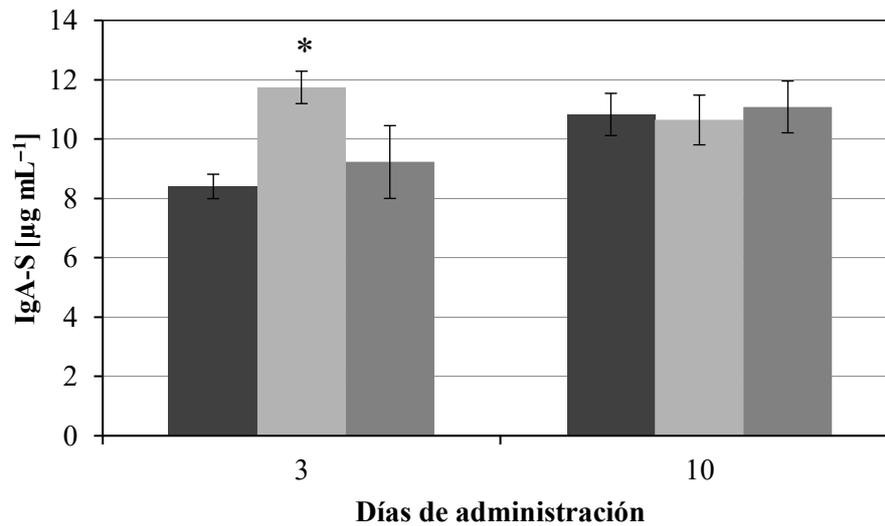


Figura 12. IgA secretoria (IgA-S) ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm$ error estándar de la media) en fluido intestinal de ratones BALB/c del grupo control (■) o de los grupos que recibieron durante 3 o 10 días consecutivos 10^8 UFC/animal de *L. plantarum* 73a (■) o 73b (■). El grupo control recibió PBS estéril. * Diferencias significativas, en comparación, con el grupo control ($p < 0,05$).

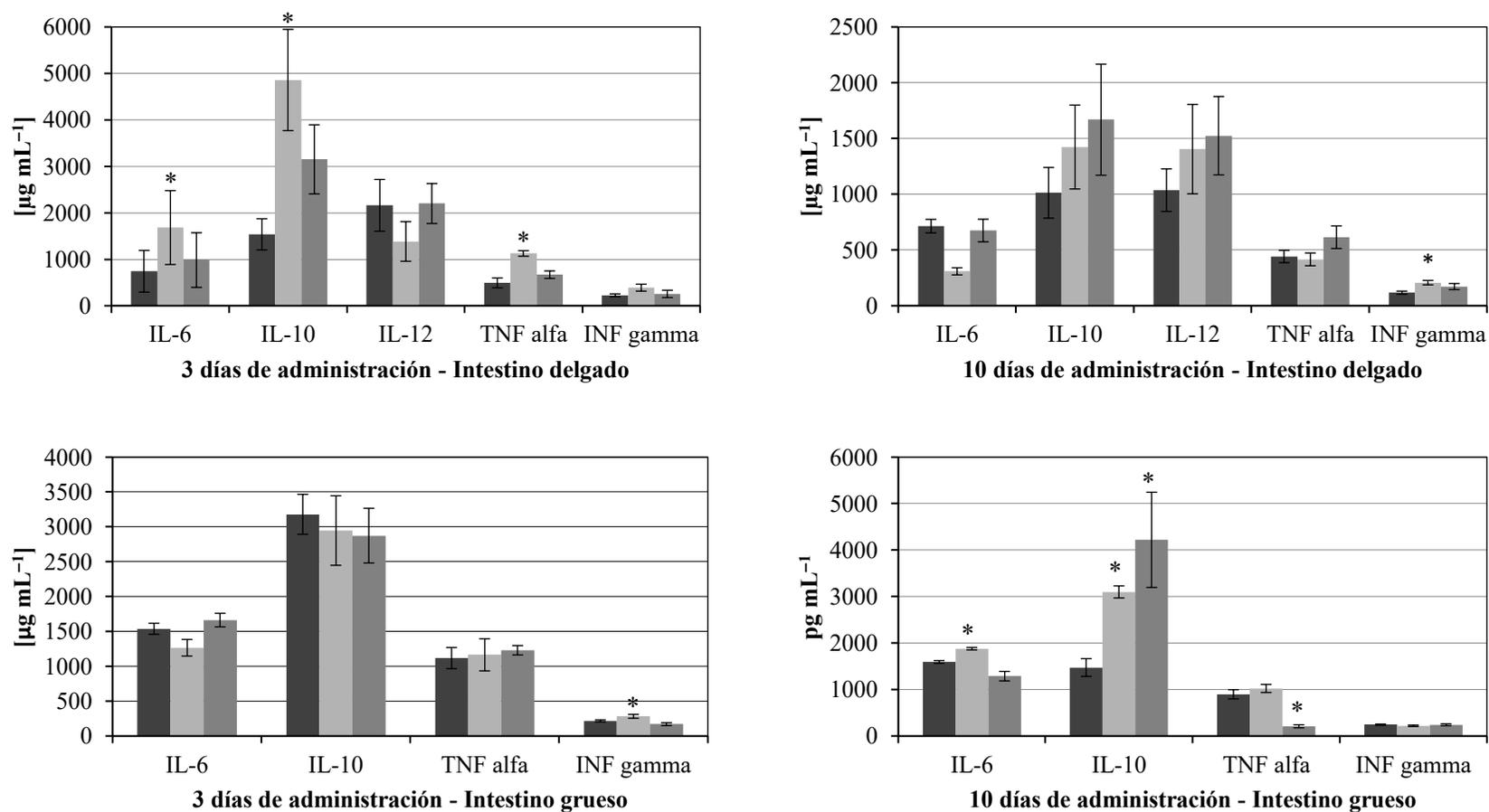


Figura 13. Concentración de citoquinas en intestino delgado y grueso en ratones BALB/c que recibieron durante 3 o 10 días: PBS estéril (grupo control: ■), o 10^8 UFC/animal de las cepas *L. plantarum* 73a (■) o 73b (■). *Diferencias significativas, en comparación, con el grupo control ($p < 0,05$).

Finalmente, en la Figura 14 se observa la concentración de AGCC en heces determinada mediante HPLC, luego de 10 días de administración de la cepa *L. plantarum* 73a. No se observaron diferencias significativas para ninguno de los ácidos grasos estudiados entre los grupos considerados (Fig. 14).

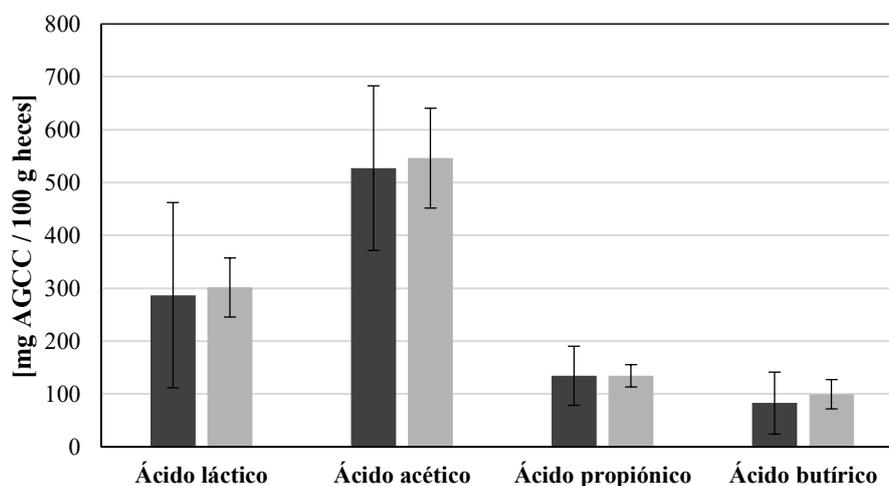


Figura 14. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces de ratones BALB/c que recibieron durante 10 días: PBS estéril (grupo control: ■), o 10^8 UFC/animal de *L. plantarum* 73a (▒). Las concentraciones de cada AGCC se determinaron por triplicado.

4.6 Fermentación de productos comerciales de base vegetal

Se evaluó la capacidad fermentativa de *L. plantarum* 73a y *L. rhamnosus* VTT E-97800 en matrices vegetales comerciales. Con esta finalidad, se realizaron fermentaciones (24 h, 30 °C) a una concentración inicial de 10^6 UFC mL⁻¹ en los siguientes productos: bebida de avena (Valio®, Finlandia), shot de frutilla-zanahoria-manzana (Valio®) y jugo de manzana (Valio®). Como control negativo, los productos sin inocular fueron incubados en las mismas condiciones. Se empleó como referencia *L. rhamnosus* VTT E-97800, ya que se habían realizado estudios previos de fermentación con esta cepa en el Instituto VTT Technical Research Centre of Finland [179]. En la Tabla 8 se muestran

los resultados obtenidos de pH y \log_{10} UFC mL⁻¹ después de la fermentación y posterior almacenamiento durante 4 días a 5 °C.

El mayor crecimiento se observó en la bebida de avena y el menor desarrollo en el jugo de manzana, para ambas cepas. No se observaron diferencias significativas entre las cepas al comparar los niveles de células viables para la bebida de avena y el *shot* frutilla-zanahoria-manzana, aunque sí se observó un aumento significativo del número de células viables de *L. rhamnosus* VTT E-97800 en el jugo de manzana. Cuando se analizó la estabilidad de las cepas en el tiempo, se observaron diferencias significativas entre *L. rhamnosus* VTT E-97800 y *L. plantarum* 73a en la bebida de avena y el jugo de manzana. *L. plantarum* 73a presentó una mejor estabilidad en la bebida de avena, pero *L. rhamnosus* VTT E-97800 en el jugo de manzana.

Tabla 8. Fermentación de productos de base vegetal con *L. rhamnosus* VTT E-97800 y *L. plantarum* 73a.

Productos	Inicial log ₁₀ UFC mL ⁻¹	Fermentado log ₁₀ UFC mL ⁻¹	4 d - 5 °C log ₁₀ UFC mL ⁻¹	pH inicial	pH del fermentado	pH luego de 4 d - 5 °C
Bebida de avena sin inocular	NC	< 1	< 1	6,35 ± 0,01	6,26 ± 0,00	6,20 ± 0,01
Bebida de avena + E-97800	6	8,31 ± 0,56 ¹	8,31 ± 0,17 ^{1,2}	6,35 ± 0,01	3,44 ± 0,00	3,40 ± 0,01
Bebida de avena + 73a	6	8,37 ± 0,04 ¹	8,54 ± 0,07 ^{1,2}	6,35 ± 0,01	3,40 ± 0,00	3,40 ± 0,08
Shot sin inocular	NC	< 1	< 1	3,64 ± 0,01	3,69 ± 0,02	3,67 ± 0,00
Shot + E-97800	6	7,05 ± 0,79 ¹	6,32 ± 0,08 ^{1b,2}	3,64 ± 0,01	3,71 ± 0,01	3,67 ± 0,01
Shot + 73a	6	8,53 ± 0,10 ¹	7,95 ± 0,33 ^{1b,2}	3,64 ± 0,01	3,70 ± 0,01	3,68 ± 0,01
Jugo de manzana sin inocular	NC	< 1	< 1	3,54 ± 0,01	3,57 ± 0,01	3,51 ± 0,01
Jugo de manzana + E-97800	6	6,44 ± 0,43 ^{1a}	5,53 ± 0,07 ^{1c,2d}	3,54 ± 0,01	3,57 ± 0,01	3,51 ± 0,01
Jugo de manzana + 73a	6	5,32 ± 0,15 ^{1a}	4,58 ± 0,12 ^{1c,2d}	3,54 ± 0,01	3,57 ± 0,01	3,51 ± 0,01

¹Se determinaron las diferencias significativas de células viables (log₁₀ UFC mL⁻¹) de la misma matriz alimenticia, pero fermentada con *L. plantarum* 73a o *L. rhamnosus* VTT E-97800, mediante la prueba T *student* para muestras independientes. ²Se determinaron las diferencias significativas de células viables (log₁₀ UFC mL⁻¹), antes y después del almacenamiento, de cada producto con misma cepa y matriz alimenticia mediante la prueba T para muestras dependientes. Las diferencias se consideraron significativas para valores de p < 0,05. ^{1a}p = 0,014, ^{1b}p = 0,010, ^{1c}p = 0,000 y ^{2d}p = 0,045.

NC: no corresponde, E-97800: *L. rhamnosus* VTT E-97800, 73a: *L. plantarum* 73a.

5. Discusión

El desarrollo de cultivos probióticos aislados de fuentes locales es de creciente interés debido a múltiples factores. Se conoce, por ejemplo, que existen diferencias en la microbiota intestinal humana según la región geográfica y sus requerimientos nutricionales. Por lo tanto, la elaboración de productos funcionales con cepas autóctonas y viables en matrices alimenticias regionales brinda la oportunidad de valorizar alimentos y desarrollos locales [187]. El trabajo pionero de Martín y col. (2003) indicó que la leche materna es una fuente potencial de probióticos. Posteriormente, se realizaron numerosos trabajos en diferentes lugares sobre el aislamiento de bacterias lácticas y bifidobacterias a partir de leche materna, para su uso como probióticos. Algunos de ellos fueron realizados en India [188–190], Argentina [9], España [69], Chile [191], Brasil [192,193], China [194], EEUU [195], Malasia [196], Irán [197,198] y Taiwán [199], entre otros. Considerando la importancia de la leche materna en la colonización temprana del intestino y sus beneficios en la infancia, la leche materna es una fuente atractiva para el aislamiento de nuevos probióticos.

En nuestro laboratorio, por ejemplo, se aislaron cepas del género *Bifidobacterium* a partir de muestras de leche materna [9]. Entre los aislamientos, se seleccionó la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 por su mejor desempeño en estudios tecnológicos. Luego, *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 fue considerada como un potencial probiótico debido a su capacidad protectora en el modelos murinos de enterocolitis aguda y crónica [91]. Estos resultados destacan la importancia de la caracterización funcional y tecnológica para el aislamiento de nuevos probióticos. En particular, en este estudio nos enfocamos en el aislamiento de *Lactobacillus* a partir de leche materna, el género más utilizado en el desarrollo de probióticos [74]. De esta forma, podríamos contar, además de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, con una cepa del género *Lactobacillus* para cultivos de probióticos multicepas. Se conoce, por ejemplo, que la suplementación simultánea de cepas de lactobacilos y bifidobacterias presenta mayor efectividad en la prevención de enterocolitis necrotizante en bebés prematuros que la suplementación individual de cada una de ellas, según un estudio de meta-análisis reciente [200].

Actualmente, técnicas dependientes e independientes del cultivo demostraron que las especies más abundantes en leche materna son *Streptococcus* y *Staphylococcus*, seguidas por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* y algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae [8,201]. En concordancia con estos trabajos y el análisis de la secuenciación masiva realizado en el Capítulo 1 de este trabajo de Tesis, se detectó la presencia de cocos en la mayoría de las muestras analizadas, pero estos microorganismos no fueron considerados para su estudio posterior. A pesar de que algunas cepas de *S. epidermidis* y *Streptococcus salivarius* de leche materna han reportado actividad antimicrobiana *in vitro* contra cepas patogénicas de *S. aureus* [27], son necesarios más estudios para que sean consideradas como potenciales probióticos. Las especies aisladas de lactobacilos y bifidobacterias se encontraron sólo en menos del 10 % de las muestras de leche materna analizadas, pero debido a su estatus GRAS fueron consideradas para su caracterización como potenciales probióticos. La mayoría de las especies aisladas habían sido reportadas como presentes en leche materna [9,17,202], excepto *L. gallinarum* que se considera de origen entérico y solo se emplea como probiótico en la industria avícola [203].

Con el objetivo de seleccionar potenciales probióticos, se llevaron cabo estudios de hidrofobicidad y co-cultivos con macrófagos murinos. La hidrofobicidad ha sido relacionada con la adhesión a la mucosa intestinal del huésped o con la capacidad de agregación, floculación y remoción de patógenos [204]. El ensayo *in vitro* de hidrofobicidad es limitado en cuanto a su capacidad de predecir el potencial probiótico, sin embargo, es una prueba simple usada en trabajos previos para predecir la adhesión de bacterias a células eucariotas [174,204]. El ensayo está basado en la adherencia bacteriana a diferentes compuestos hidrocarbonados y se correlaciona de forma moderada con la adhesión *in vivo* [205]. Los co-cultivos de células eucariotas con microorganismos son una herramienta útil en la selección de nuevos probióticos [167]. Las cepas capaces de inducir la secreción de citoquinas como IL-10 son de gran interés por su potencial capacidad antiinflamatoria *in vivo* [206]. Patologías como enterocolitis necrotizante, obesidad, inflamación intestinal, alergias o enfermedades autoinmunes parecerían ser mitigadas por los efectos antiinflamatorios de algunas cepas de probióticos [207–209]. Teniendo en cuenta los resultados de hidrofobicidad y la

capacidad de inducir la secreción de IL-10, las cepas *L. gasseri* 70a, *L. gasseri* 70c, *L. plantarum* 73a y *L. plantarum* 73b se seleccionaron para los estudios *in vivo*. Aunque las cepas *L. plantarum* 73a y *L. plantarum* 73b presentaron una hidrofobicidad menor al 50 %, esto no fue motivo suficiente para descartarlas. Se conoce que varias cepas comerciales, exitosas en estudios clínicos de eficacia, pueden presentar niveles bajos de hidrofobicidad y adhesión *in vitro*. Por ejemplo, *L. rhamnosus* GG y *L. casei* Shirota presentan baja adhesión a células Caco-2 [210].

La aptitud tecnológica de las cepas aisladas fue estudiada con relación a la pérdida de viabilidad al proceso de liofilización y conservación de los cultivos deshidratados obtenidos. La liofilización es el proceso más comúnmente empleado en la industria para la producción de cultivos probióticos deshidratados [211]. El uso de agentes protectores como leche descremada, mono-, di- y polisacáridos, proteínas o mezclas de éstos [212] tiene como objetivo incrementar la viabilidad celular a la deshidratación [211]. En nuestro estudio, la lactosa fue el protector más adecuado durante el proceso de liofilización para la mayoría de las cepas. La combinación de lactosa con trehalosa o maltosa ha sido reportado como un crioprotector satisfactorio para la liofilización de *L. rhamnosus* GG [213]. Asimismo, la a_w de los cultivos luego de la liofilización fue evaluada como predictor del éxito de la sobrevida a largo plazo. En nuestro caso, todos los liofilizados obtenidos presentaron una $a_w < 0,2$. Valores mayores de a_w se correlacionaron con una disminución de la viabilidad durante la conservación a largo plazo [185].

La sobrevida de los cultivos liofilizados durante el almacenamiento es afectada por una combinación de factores, entre los que se encuentran la naturaleza del protector, la a_w , la temperatura de almacenamiento y la permeabilidad al oxígeno de los recipientes empleados. En este sentido, se conoce que los disacáridos son protectores satisfactorios y actúan mediante el reemplazo del agua citoplasmática y la disminución de la formación de cristales intracelulares [211,214]. A pesar de que la combinación de L o PDX con leche o trehalosa es considerada un mejor agente protector [185,213], la mayor ventaja de usar solamente L o PDX es el menor costo, en comparación, con la trehalosa. La exposición a altas temperaturas durante el almacenamiento favorecen la

desnaturalización de proteínas y oxidación de los fosfolípidos de la membrana, favoreciendo la disminución de la viabilidad celular [211]. En general, las cepas de *L. plantarum* presentaron la mayor sobrevida. En cambio, las cepas más sensibles al proceso fueron las de *L. gasseri*. Es importante destacar que entre las cepas de *L. plantarum* se observaron resistencias diferentes. Por ejemplo, en el almacenamiento acelerado, la pérdida de viabilidad celular en L para *L. plantarum* 42 fue de 0,42 log₁₀ UFC mL⁻¹, en cambio para *L. plantarum* 39a fue de 2,18 log₁₀ UFC mL⁻¹. Finalmente, se hipotetizó que la pérdida de viabilidad celular en condiciones extremas y a corto plazo (almacenamiento acelerado), podría brindar información del comportamiento de los liofilizados en condiciones de almacenamiento estándar (5 °C o 25°C, 12 meses). Siguiendo esta hipótesis, se correlacionó la pérdida de viabilidad celular de los liofilizados a largo plazo con la observada luego del almacenamiento acelerado (Fig. 9). La marcada dependencia de la pérdida de viabilidad con la cepa dificultó encontrar una correlación satisfactoria para determinar, en un corto plazo, el mejor agente protector o la cepa más promisoría.

El cultivo de probióticos a gran escala es también otro punto para considerar al momento de pensar en su aplicación industrial. En este sentido, el medio de cultivo MRS [215] es ampliamente utilizado en los laboratorios para el desarrollo de lactobacilos. Sin embargo, este medio es económicamente inviable tal cual está formulado para la producción de biomasa a escala piloto o industrial. Una estrategia común consiste en adaptar la formulación a los requerimientos específicos de las cepas de interés, disminuyendo la concentración de sus componentes más costosos, que son las fuentes de Nitrógeno. Un análisis de costos hecho a partir de proveedores locales (Cicarelli y Microquim) indicó que la pluripeptona y extracto de levadura pueden representar hasta el 70 % del costo del medio de cultivo, considerando su formulación a partir de sus ingredientes. Por lo tanto, ambos ingredientes, y tres de las cepas seleccionadas, fueron considerados para el diseño experimental 2² factorial con el objeto de hacer la producción de biomasa más costo-efectiva. Se seleccionaron *L. gasseri* 70c y *L. plantarum* 73a y 73b por su efectividad en la inducción de IL-10. El efecto positivo del extracto de levadura ha sido reportado previamente en el crecimiento bacteriano [216–218]. Este efecto puede deberse al mayor contenido de compuestos nitrogenados, bases nitrogenadas como la

purina y pirimidina y vitaminas [219]. Además, las especies *L. gasseri* y *L. plantarum* han sido descritas como incapaces de crecer en leche sin la suplementación de extracto de levadura o peptona [220,221]. Por lo tanto, si se considera disminuir uno de los ingredientes estudiados, podría reducirse el extracto de levadura para *L. gasseri* 70c y la pluripeptona para *L. plantarum* 73b. En el caso de *L. plantarum* 73a, la concentración de ambos ingredientes podría limitarse al mínimo del rango de estudio y es probable que su crecimiento sea promovido por el extracto de carne, otro de los componentes del medio de cultivo MRS.

Al mismo tiempo que se evaluó la aptitud tecnológica de las cepas aisladas, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* con ratones para determinar la funcionalidad en estos modelos animales. Uno de los ensayos fue realizado *in vivo* para la prevención de infección por *Salmonella*. Este es un ensayo relativamente simple en comparación con diseños experimentales más sofisticados como los modelos de inmunomodulación, cáncer o colitis. Pero, aun así, permite la selección preliminar de cepas con potencial probiótico, ya que varios mecanismos inmunológicos están implicados durante la infección y su eventual prevención [222]. En el primer ensayo *in vivo* se estudiaron tres cepas de lactobacilos, observándose una tendencia no significativa en la protección contra la infección. Como el tamaño de la muestra se correlaciona positivamente con el poder estadístico de la prueba [223], se propuso repetir la experiencia con un número mayor de animales por grupo, con el fin detectar diferencias significativas, si las hubiera. En el segundo ensayo, la capacidad protectora frente a la infección por *Salmonella* fue significativa cuando se administró *L. plantarum* 73a por 10 días consecutivos. Finalmente, en el último ensayo *in vivo*, se evaluó la capacidad inmunomoduladora de las cepas *L. plantarum*, 73a y 73b. Un mayor efecto inmunomodulador se observó en los animales tratados con *L. plantarum* 73a, en comparación con los tratados con *L. plantarum* 73b. Asimismo, *L. plantarum* 73a fue capaz de activar cuatro citoquinas estudiadas en intestino delgado y tres de cuatro en intestino grueso.

El intestino delgado es el principal sitio inductor de la respuesta inmunológica innata y adaptativa [224]. La capacidad protectora de *L. plantarum* 73a contra la infección por *Salmonella* podría ser explicada por la activación inmunológica del intestino delgado,

luego de la administración de esta cepa. Se conoce que el intestino es el principal foco de infección de este patógeno [225]. El aumento de la liberación de la citoquina antiinflamatoria IL-10 podría actuar fortaleciendo la barrera epitelial del intestino [226] y favoreciendo, al menos parcialmente, la mayor sobrevivencia frente a la infección. El INF gamma es crucial en infecciones intracelulares causadas por *Salmonella*, activando principalmente a los macrófagos, quienes se encargarían de resolver la infección [227]. Por ejemplo, se conoce que en ratones *knock-out* para el gen INF gamma (INF gamma - / -), al ser infectados por *Salmonella*, la inmunidad de la mucosa intestinal disminuye y la infección progresa a septicemia [228]. IL-6, junto a otras citoquinas como IL-2 y GM-CSF, aumentan en modelos murinos durante la salmonelosis [227]. IL-6 podría contribuir en la eliminación de agentes patógenos y en la restauración del tejido epitelial [229]. A pesar de que TNF alfa es conocido por su actividad proinflamatoria, en conjunto con otras citoquinas como IL-6 y IL-17 promueve la proliferación epitelial [230], lo que en nuestro estudio podría haber contribuido, en parte, en la reparación del daño epitelial causado durante la infección. Además, INF gamma es capaz de activar TNF alfa para resolver la infección [227]. El incremento de IgA actúa como primera línea de defensa contra patógenos, limitando el acceso de antígenos y controlando así la respuesta inmune inflamatoria. En el trabajo de Zacarías y col. (2014), una mayor sobrevivencia post infección de los animales tratados con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 se correlacionó con un incremento de IL-10 e IgA-S.

Considerando los resultados positivos *in vivo* se propuso determinar la potencial aplicación de *L. plantarum* 73a en matrices alimenticias de origen vegetal. Teniendo en cuenta que en la actualidad existe un creciente interés por productos de base vegetal debido a restricciones alimentarias, estilos de vida (veganismo) y a los beneficios sobre la salud percibidos en relación al mayor consumo de fibras [232]. En este sentido, la fermentación de matrices vegetales con probióticos genera posibilidades de desarrollar nuevos alimentos. Con el objetivo de evaluar el potencial uso de *L. plantarum* 73a, y *L. rhamnosus* VTT E-97800 como cepa control, en productos de origen vegetal, se realizaron fermentaciones en jugo de manzana, bebida de avena y un *shot* frutilla-zanahoria-manzana. Los productos seleccionados fueron de composición y pH variado. Posterior a la fermentación, se observó la estabilidad en el tiempo a 5 °C por al menos 4

días. Se registró el pH y la concentración celular, antes y después de la fermentación y durante el almacenamiento. La bebida de avena fue una matriz satisfactoria en términos de crecimiento celular y disminución de pH, no así el jugo de manzana. El pH neutro de la bebida de avena podría haber favorecido el crecimiento de las cepas ensayadas. En el caso del *shot* de frutilla-zanahoria-manzana y el jugo de manzana puro, el pH ácido y el ácido málico de la manzana podrían ser responsables de la disminución de la viabilidad celular. Se reportó que ácidos orgánicos como el ácido málico del jugo de manzana producen un daño celular mayor que ácidos inorgánicos frente a las mismas condiciones de pH [179]. En relación con la estabilidad en el tiempo de los productos fermentados, *L. plantarum* 73a presentó una mejor estabilidad en el *shot* frutilla-zanahoria-manzana. Mientras que *L. rhamnosus* VTT E-97800 en el jugo de manzana, ambos productos de pH ácido. Esto remarca la importancia de la selección de cepas en relación a la resistencia a ácidos orgánicos y pH [233]. Los resultados obtenidos en este capítulo demostraron algunos aspectos tecnológicos y funcionales de la cepa *L. plantarum* 73a alentadores para ser profundizados en vistas a su aplicación en la industria alimenticia o como suplemento dietario.

6. Conclusión

En esta parte del trabajo se lograron aislar lactobacilos y bifidobacterias de al menos el 10 % de las muestras de leche materna analizadas. Las cepas se seleccionaron teniendo en cuenta la inducción de IL-10 en co-cultivos con macrófagos murinos y según su hidrofobicidad. Las cepas *L. gasseri*, 70a y 70c y *L. plantarum*, 73a y 73b se consideraron para estudios posteriores de funcionalidad.

En general, las cepas exhibieron sobrevida satisfactoria frente al proceso de liofilización y el almacenamiento a largo plazo a 5 °C. Los protectores lactosa y povidexrosa fueron adecuados durante los procesos de liofilización y almacenamiento de dichas cepas. El almacenamiento acelerado no fue adecuado para correlacionar la sobrevida a largo plazo. La administración de *L. plantarum* 73a fue capaz de proteger contra una infección por *Salmonella* en un modelo murino mediante la activación del sistema inmune del intestino delgado.

Capítulo 3

Potencial uso de bacterias aisladas de leche materna como tratamiento de la obesidad infantil

1. Introducción

La obesidad infantil, principalmente en zonas urbanas, es uno de los mayores desafíos que enfrenta la salud mundial [234]. La intervención temprana durante la infancia, reduciría el riesgo de padecer obesidad en etapa adulta y comorbilidades asociadas como el síndrome metabólico, la diabetes de tipo 2, enfermedades cardiovasculares, esteatosis hepática y dislipidemia [44,235]. El desarrollo de sobrepeso y obesidad infantil está influenciado en parte por la microbiota intestinal, la falta de actividad física y una dieta rica en azúcares y grasas [236]. Actualmente, se conoce que el balance energético es determinado en gran medida por la interrelación entre la composición de la microbiota intestinal y la dieta de los individuos [237,238]. Además, una dieta rica en lípidos y una microbiota “obesa”, favorecen el desarrollo de inflamación crónica, agravando aún más las patologías asociadas al sobrepeso [239]. En la obesidad se observan en el intestino niveles bajos de bacterias consideradas antiinflamatorias como las bifidobacterias. Este desbalance resulta perjudicial para el normal funcionamiento de la barrera intestinal, favoreciendo el ingreso de antígenos que pueden producir inflamación sistémica [240].

El consumo de probióticos y prebióticos podría ayudar a mitigar los efectos perjudiciales de la obesidad mediante la modulación de la microbiota [241]. Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se han utilizado ampliamente como probióticos e incluso, cepas específicas reportaron disminuir la obesidad y mejorar distintos parámetros metabólicos [241,242]. Por ejemplo, un estudio piloto en niños obesos demostró que el consumo de una bebida suplementada con *Lacticaseibacillus casei* Shirota (denominación anterior *Lactobacillus casei*, Zheng y col. 2020) favoreció la pérdida de peso y el incremento de lípidos de alta densidad en sangre, y en heces la concentración de *Bifidobacterium* y ácido acético [243]. El desarrollo de la obesidad parece también estar precedido por una disminución de bifidobacterias en el intestino [237]. En otro trabajo, la administración de una mezcla de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* ATCC B3208, *Bifidobacterium lactis* DSMZ 32269, *Bifidobacterium bifidum* ATCC SD6576, *L. rhamnosus* DSMZ 21690) a niños y adolescentes obesos con patologías como hígado graso no

alcohólico demostró efectos positivos, reduciendo los índices de colesterol, lípidos de baja densidad y triglicéridos [244].

Los modelos de fermentación colónica *in vitro* son una herramienta útil para estudiar potenciales probióticos y sus efectos en la composición de la microbiota intestinal normal o con distintas patologías. El modelo *in vitro* SHIME[®], siglas en inglés de *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*, es un simulador dinámico *in vitro* validado de la microbiota intestinal humana. Este modelo permite el estudio de la comunidad microbiana y sus metabolitos [245–247]. En nuestro laboratorio, se aislaron las cepas *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y *L. plantarum* 73a (Cap. 2) a partir de muestras de leche materna. Ambas cepas demostraron *in vivo* una capacidad protectora contra la infección por *Salmonella* [167,231,248], y a su vez, *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 la capacidad de proteger parcialmente contra la enterocolitis aguda y crónica en un modelo murino [91]. A su vez, *L. plantarum* 73a fue capaz de estimular la liberación de IL-10 en co-cultivo con macrófagos murinos y en ensayos *in vivo* con ratones [248].

2. Objetivos:

- Determinar la capacidad de resistencia a barreras fisiológicas de las cepas *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y *L. plantarum* 73a.
- Estudiar el impacto de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y *L. plantarum* 73a en la microbiota fecal de un niño obeso utilizando el simulador *in vitro* de la microbiota intestinal humana, SHIME®.

3. Materiales y métodos

3.1 Cultivos bacterianos

B. animalis subsp. *lactis* INL1 [9,91,167,231] y *L. plantarum* 73a [248] empleadas en este Capítulo, fueron aisladas a partir de leche materna en un trabajo previo de nuestro laboratorio y durante el desarrollo de esta tesis (Cap. 2), respectivamente. Las mismas pertenecen a la colección del INLAIN y se conservan congeladas en MRS con glicerol (20 %) y liofilizadas. Antes de su utilización, se cultivaron en caldo MRSc por 18 h en anaerobiosis (Anaeropack-Anaero, Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., Japón) a 37 °C. Se centrifugaron los cultivos (3000 × g, 10 min, 8 °C) y los *pellets* obtenidos se lavaron dos veces con solución salina al 0,85 % (p/v) (Baker Analyzed® A.C.S., EEUU), para ser finalmente resuspendidos en un medio basal de carbohidratos. El medio basal de carbohidratos contenía 4,0 g L⁻¹ de almidón (Maizena, Brasil), 4,0 g L⁻¹ de mucina porcina (Sigma, EEUU), 3,0 g L⁻¹ de extracto de levadura (Kasvi, Brasil), 1,0 g L⁻¹ de arabinogalactano (Sigma, EEUU), 2,0 g L⁻¹ pectina de manzana (Sigma, EEUU), 1,0 g L⁻¹ de peptona (Kasvi, Brasil), 0,5 g L⁻¹ de L-cisteína (Sigma, EEUU) y 0,4 g L⁻¹ de D-glucosa (Synth, Brasil).

3.2 Protocolo experimental del SHIME®

El SHIME ® fue desarrollado por investigadores de la Universidad de Gante (Gante, Bélgica) y validado por Molly y col. (1994). El sistema, una vez puesto en marcha, es capaz de mimetizar y mantener por varios meses la diversidad microbiana humana del sistema gastrointestinal [249]. Con la finalidad de obtener replicas en simultáneo para el análisis estadístico, se adaptó el simulador gastrointestinal de la Escuela de Ciencias Farmacéuticas (Departamento de Ciencia de los Alimentos y Nutrición, Universidade Estadual Paulista, Brasil). Los reactores correspondientes al colon transversal y descendente fueron reemplazados por tres réplicas del colon ascendente (Fig. 15). Se controló el pH automáticamente, agregando una solución 0,5 mol L⁻¹ de NaOH o HCl. Se agitaron los cuatro reactores en forma continua mediante agitadores magnéticos, mientras que se mantuvo la temperatura a 37 °C. Se mantuvieron las condiciones de anaerobiosis en forma continua mediante el flujo diario de N₂ por 30 min. Para simular

el duodeno, un flujo de 4 mL min^{-1} durante 15 min de jugo pancreático artificial ingresó al reactor 2 (Fig. 15). La composición de jugo pancreático artificial fue de $12,5 \text{ g L}^{-1}$ de NaHCO_3 (LS-Chemical, Brasil), 6 g L^{-1} de Oxigal (Sigma, EEUU) y $0,9 \text{ g L}^{-1}$ de pancreatina (Sigma, EEUU) [245,249]. Los reactores 3, 4 y 5, correspondientes al colon ascendente del SHIME[®], fueron inoculados con una mezcla de heces. El donante de materia fecal fue un niño obeso de 9 años con un IMC $> 28 \text{ kg m}^{-2}$. Como criterio de inclusión, se consideró que no presentara patologías como alergias o intolerancia a alimentos. Se consideró también que no haya consumido suplementos dietarios, medicación para enfermedades gastrointestinales o metabólicas, probióticos y/o prebióticos en los últimos tres meses, y antibióticos en los últimos seis meses. Se recolectaron muestras de heces durante 24 h y se conservaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización. Se homogenizaron las muestras de materia fecal y se conservó una porción (10 g) en tubos estériles de plástico a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis. Se diluyó una alícuota (10 g) de materia fecal y se homogenizó en 100 mL de buffer de fosfato estéril ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7), suplementado con 1 g L^{-1} tioglicolato de sodio como agente reductor.

En el período de estabilización (E), se estabilizó el inóculo fecal durante dos semanas en el medio de carbohidratos descrito previamente (Cap.3, Sec. 3.1). Durante la estabilización, se adaptó la microbiota fecal a las condiciones ambientales específicas del colon en términos de rango de pH, tiempo de retención y las fuentes de carbono disponibles [245]. Luego, el protocolo experimental del SHIME[®] (Fig. 15) incluyó dos semanas de tratamiento con *L. plantarum* 73a (Lp), una semana de lavado (*wash-out*, WO) donde se administró solo el medio de carbohidratos y finalmente, dos semanas de tratamiento con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y *L. plantarum* 73a (Lp – B). Durante los tratamientos, se administró diariamente 10^{10} UFC de *L. plantarum* 73a (Lp) o 10^{10} UFC de *L. plantarum* 73a y de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en simultáneo (Lp – B). Al finalizar cada período experimental (E, Lp, WO y Lp – B), se recolectaron muestras de los reactores para la determinación de amonio (NH_4^+), AGCC y la secuenciación parcial del gen 16S ARNr. Estas muestras se conservaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

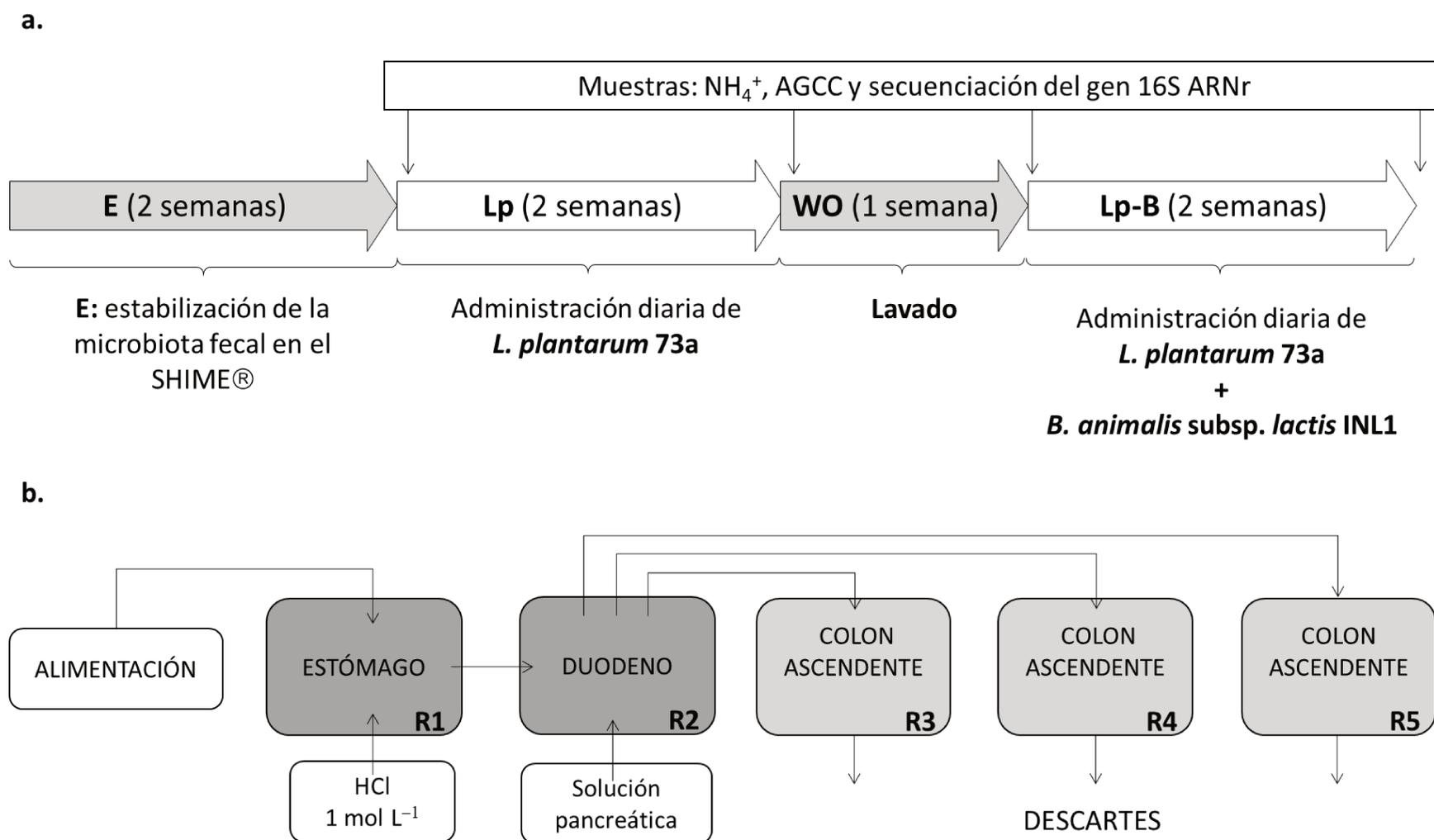


Figura 15. a. Protocolo experimental del SHIME® y b. Diagrama esquemático del SHIME®.

3.3 Análisis de ácidos grasos de cadena corta y los iones amonio

Para las determinaciones de AGCC, se centrifugaron tres muestras del colon ($n = 3$) ($18800 \times g$, 5 min) y se diluyeron los sobrenadantes en agua ultrapura en una relación 3: 20. Luego, se adicionaron a 2 mL de la dilución previa, 1 g de NaCl, 100 μL de ácido crotónico, 70 μL isobutanol y 200 μL de H_2SO_4 (2 mol L^{-1}). Se llevó a cabo el análisis de AGCC en un cromatógrafo de gases con un detector de ionización de llama un inyector capilar de tipo *split/splitless* y un muestreador automático “CombiPAL”. Una columna HP-NNOWAX de $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$ (Agilent Technologies, EEUU) separó los AGCC usando hidrógeno a un flujo de $1,45 \text{ mL min}^{-1}$. Las temperaturas de la columna, el inyector y detector fueron de 170° , 240° y 280°C , respectivamente [250].

Se determinaron las concentraciones de iones amonio (NH_4^+) de las muestras ($n = 3$) empleando un medidor de iones selectivo (HI 4101 model, Hanna Instruments, Leighton Buzzard, Reino Unido) (10A model, Orion) acoplado a un electrodo selectivo de iones amonio (Thermo–Orion 95–12, MA, EEUU). Se calibró el equipo con una solución estándar de 10, 100 y 1000 mg L^{-1} de amonio. Antes de cada medición, se adicionó a cada muestra del colon (10 mL) una solución de amonio para ajustar la fuerza iónica y el pH de las mismas. Se realizaron las determinaciones a 25°C y por triplicado.

3.4 Determinación de la composición bacteriana mediante la secuenciación del gen 16S ARNr

La amplificación del gen 16S ARNr (V3 – V4) y secuenciación por Illumina fueron llevadas a cabo por “Neopropecta Microbiome Technologies SA” (Florianópolis, SC, Brasil), según Christoff y col. (2017). Brevemente, se centrifugaron ($18800 \times g$, 5 min) alícuotas del colon (4 mL) y se congeló el pellet a -70°C por 24 h e inmediatamente se liofilizaron por 24 h a 0,0010 mBar a -50°C en el equipo “Freezone 4.5, Labconco” (EEUU). Las extracciones de ADN se llevaron a cabo utilizando perlas magnéticas y siguiendo el protocolo provisto por “Neopropecta Microbiome Technologies”. Para la amplificación de la región V3–V4 del gen 16S ARNr se emplearon los cebadores de V3–V4 341F–806R [252,253]. Se purificaron los fragmentos amplificados con el kit “AMPureXP” (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) y se distribuyeron las muestras en

librerías para la posterior cuantificación. Se llevó a cabo la cuantificación de las librerías mediante qPCR usando el kit “KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms” (KAPA Biosystems, Woburn, MA, EEUU). Se secuenciaron las librerías mediante corridas “single-end” 2 × 300 pb (MiSeq Reagent kit v2) en la plataforma “MiSeq-Illumina”.

3.5 Análisis bioinformático de los datos de la secuenciación masiva

Las secuencias crudas fueron procesadas utilizando una versión modificada de *pipeline* propuesto por Logares (2017) (<https://github.com/ramalok>). Primero, se usó el *software* “SPAdes v3.5.0” [116] para corregir errores de sustitución ocurridos durante la secuenciación; este *software* emplea algoritmos basados en el agrupamiento de HAMMER en base a los valores de calidad de las secuencias e introduce sanciones bayesianas (BAYES HAMMER *tool*) [117]. Luego, se realizó un filtrado de secuencias en base a la calidad de las mismas, usando la función “fastq_filter” del programa “USEARCH-v10” [118]. Las secuencias que pasaron el control de calidad fueron luego analizadas usando “UNOISE2” [119] con el objetivo de definir las OTUs sin agrupamientos (*zero-radius OTUs* [zOTUs]) [120,121]. Finalmente, las zOTUs definidas fueron asignadas taxonómicamente a mediante BLAST [122], usando la base de datos SILVA (SSU Ref 132 NR 99) como referencia y las tablas de zOTU fueron creadas con la función “otutab” en “USEARCH-v10” [123]. Para los cálculos de diversidad y riqueza y análisis posteriores; se consideraron solamente aquellas zOTUs con abundancia mayor o igual a 10 secuencias, para asegurarnos que nuestras conclusiones no estén sesgadas por errores de secuenciación. Para poder realizar la comparación entre las muestras evitando sesgo por esfuerzo de muestreo, se realizó un submuestreo aleatorio en cada una de ellas en base a la muestra de menor número de secuencias.

A continuación, se utilizó el paquete de datos “vegan v.2.5” del *software* R (R team, 2019) para crear las curvas de rarefacción de las zOTU y determinar los índices de diversidad y riqueza (Shannon [124], Simpson [125] y Chao1 [126]) de las muestras de estudio. Además, se realizó el gráfico NMDS (siglas en inglés de *Non-Metric Multidimensional Scaling*) utilizando el *software* R.

3.6 Análisis estadístico

Un análisis de PERMANOVA (9999 permutaciones) fue desarrollado en matrices triangulares Bray–Curtis para examinar las diferencias en la composición bacteriana de las *zOTUs* correspondientes a los períodos de E, Lp, WO y Lp – B. A continuación, un análisis de SIMPER determinó las *OTUs* que más contribuyeron a las diferencias observadas entre los períodos estudiados, empleando el *software* PAST (Øyvind Hammer, *Natural History Museum, University of Oslo*) [127].

Las concentraciones de AGCC y NH_4^+ se presentaron como la media y las desviaciones estándar de tres replicas experimentales. Se realizó el análisis de ANOVA post hoc Tukey o Kruskal-Wallis para las muestras de AGCC, NH_4^+ y la abundancia relativa a nivel filo, clase, orden y familia, según la distribución de los datos (paramétricos o no paramétricos). Se llevaron a cabo correlaciones de Spearman entre la abundancia relativa de las familias y la producción de metabolitos, luego se visualizaron las correlaciones obtenidas mediante un *heatmap* empleando la herramienta web “ClustVis” [254]. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. Se analizó la normalidad de los datos mediante la prueba de normalidad de Ryan-Joiner. Se realizaron estos análisis utilizando el programa “IBM SPSS Statistics 22.0” (2013) [255].

4. Resultados

4.1 Composición de bacteriana

Se analizó la composición bacteriana durante el experimento mediante secuenciación masiva del gen 16S ARNr (Illumina). Las curvas de rarefacción determinaron que las lecturas permitieron secuenciar en casi su totalidad la riqueza de las muestras (S5). Se detectó la especie *L. plantarum* en todos los períodos, excepto en la estabilización (E) (Fig. 16).

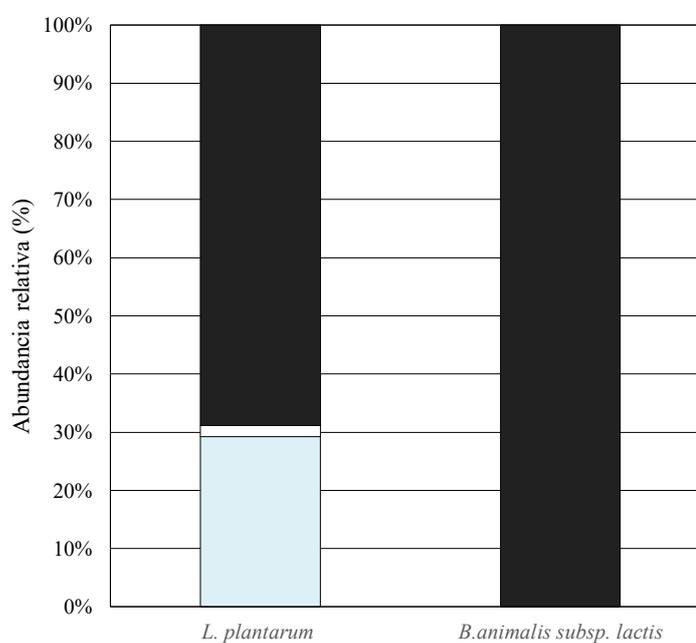


Figura 16. Abundancia relativa de *L. plantarum* y *B. animalis subsp. lactis* en el SHIME® con muestras de materia fecal de un niño obeso durante la experiencia. Períodos: E (■): estabilización, Lp (■): tratamiento con *L. plantarum* 73a, WO (□): *wash-out* y Lp – B (■): tratamiento con *L. plantarum* 73a y *B. animalis subsp. lactis* INL1.

Cuando se administraron ambas cepas, se incrementó significativamente la diversidad alfa, pero no la riqueza, según los índices de Shannon y Chao1 (Fig. 17). La reducción de riqueza en el período de Lp – B no fue significativa (Fig. 17).

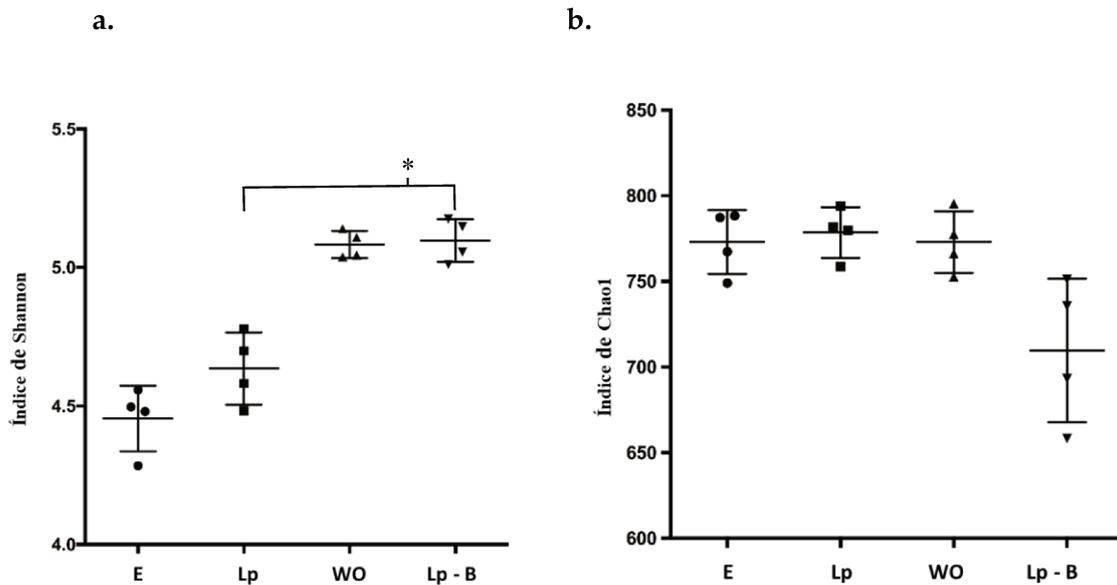


Figura 17. Diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas en el SHIME® durante la experiencia. Períodos: estabilización (E), tratamiento con *L. plantarum* 73a (Lp), wash-out (Lp) y tratamiento con *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (Lp – B).– a. Índice de Shannon de diversidad alfa y a. Índice de Chao1 de riqueza. Las diferencias significativas se observaron, en comparación con los períodos de control (E y WO) (*, $p < 0,05$) mediante el análisis de ANOVA post hoc Dunnett.

Por otro lado, la composición taxonómica fue analizada mediante un PERMANOVA – Bray Curtis, observándose cambios significativos cuando se administró *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, en comparación con los períodos de E ($p = 0,0273$) y Lp ($p = 0,0272$). La administración de *L. plantarum* 73a no modificó significativamente la composición bacteriana, en comparación con el período de E ($p = 0,0626$). Sin embargo, se observaron cambios significativos entre el período de WO y de E. Estos resultados sugieren que células de *L. plantarum* 73a fueron capaces de sobrevivir en el período de WO y modificar la comunidad microbiana, ya que no fueron lavadas o eliminadas en su totalidad del SHIME en el período de lavado, cuando no

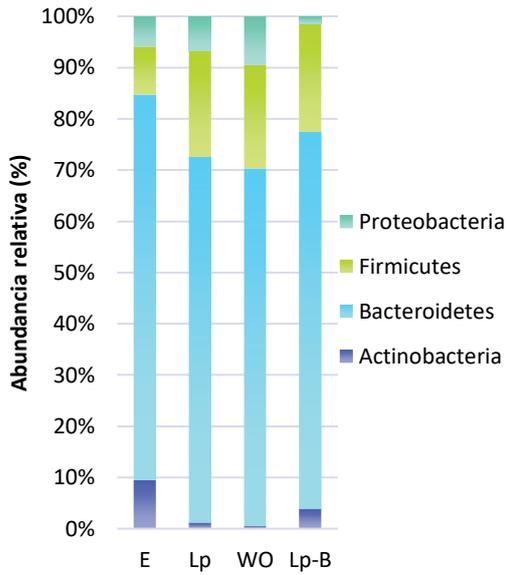
estaba siendo administrada. Los grupos taxonómicos que más contribuyeron a las diferencias observadas entre los períodos de E, Lp, WO y Lp – B fueron: *Bacteroides* (familia Bacteroidaceae, OTUs: 1, 4 y 8), *Roseburia* (familia Lachnospiraceae, OTUs: 15 y 19), *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* (familia Bifidobacteriaceae, OUT_37) y *Incertae sedis* (familia Lachnospiraceae, OTU_12), según la prueba de SIMPER. A continuación, se analizaron los filos individualmente mediante un PERMANOVA – Bray curtis. Se observaron cambios significativos en la composición del filo Bacteroidetes al comparar el período de Lp – B con el período de E ($p = 0,0267$). La composición taxonómica del filo Firmicutes presentó cambios significativos en los períodos de WO ($p = 0,03$) y de Lp – B ($p = 0,030$), en comparación con el período de E. La estructura taxonómica los filos Actinobacteria y Proteobacteria fue modificada significativamente comparando el período de E con los períodos de Lp, WO y Lp – B.

Los filos más abundantes durante la experiencia fueron Bacteroidetes y Firmicutes, seguidos por los filos Proteobacteria y Actinobacteria (Fig. 18). La abundancia del filo Proteobacteria fue significativamente menor en el período de Lp – B que en el período de E ($p = 0,008$, 9,50 a 1,46 %). Observándose, además, una reducción significativa del filo Actinobacteria en el período de WO, en comparación con la E ($p = 0,011$, 9,48 a 0,53 %). Los cambios en el filo Actinobacteria se correspondieron en su mayoría a la abundancia relativa de la familia Bifidobacteriaceae, entre la E y el WO ($p = 0,008$, 8,55 a 0,19 %). Luego, se analizaron las clases Bacilli, Clostridia, Erysipelotrichia y Negativicutes del filo Firmicutes. La abundancia relativa de la clase Bacilli aumentó a lo largo de la experiencia, pero solo fue significativa entre los períodos de E y Lp – B ($p = 0,036$, 0,05 a 1,64 %) o entre los períodos de WO y Lp – B ($p = 0,036$, 0,58 a 1,64 %). Cuando se compararon las etapas de E y Lp – B, el incremento observado en la clase Bacilli parece ser causado por la Familia Lactobacillaceae ($p = 0,003$, 0 a 1,42 %). Se observaron también incrementos significativos en las clases Erysipelotrichia ($p = 0,011$, 0,06 a 0,35 %) y Negativicutes ($p = 0,036$, 0,68 a 2,90 %) cuando se comparó la administración de Lp *versus* Lp – B. El incremento observado en la clase Erysipelotrichia se asoció con el aumento significativo de la familia Erysipelotrichacea (clase Erysipelotrichia) 0,06 a 0,35 % ($p = 0,011$) entre las etapas de administración de Lp y Lp – B. En la clase Clostridia, la familia Clostridiaceae_1 disminuyó durante la

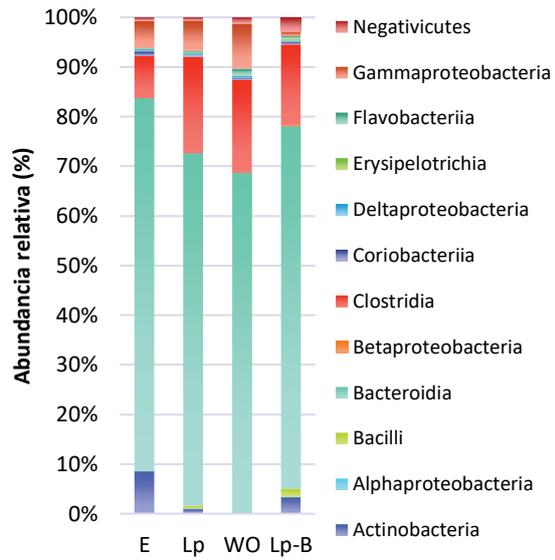
experiencia, pero solo fue significativa esta disminución entre los períodos de E y Lp – B (0,26 a 0 %, $p = 0,003$). Se identificó el género *Clostridium_sensu_stricto_1* como el más abundante la familia Clostridiaceae_1.

En el filo Proteobacteria, la clase Betaproteobacteria aumentó de 0 a 0,32 % ($p = 0,038$) y la clase Deltaproteobacteria (familia Desulfovibrionaceae) disminuyó de 0,49 a 0,21 % ($p = 0,045$), entre los períodos de E y Lp – B. La familia Comamonadaceae fue responsable de los cambios observados en la clase Betaproteobacteria y el incremento fue de 0,00 a 0,32 % entre las etapas de E y Lp – B ($p = 0,038$). Teniendo en cuenta la familia Desulfovibrionaceae (clase Deltaproteobacteria), se redujo el género *Bilophilia* desde el período de E hasta el período de Lp – B (0,49 a 0,17 %, $p = 0,045$). Por otro lado, la disminución observada entre el período de E y Lp – B de la clase Gammaproteobacteria fue principalmente debida a la familia Enterobacteriaceae (7,94 a 0,72 %, $p = 0,004$), seguidas por las familias Moraxellaceae (género *Acinetobacter*) (1,01 a 0,14 %, $p = 0,045$) y Succinivibrionaceae (0,27 a 0,01 %, $p = 0,023$). Además, la clase Gammaproteobacteria disminuyó desde 9,06 en el período de WO a 0,88 % en el período de Lp – B ($p = 0,007$). Los géneros de la familia Enterobacteriaceae que disminuyeron entre el WO y la administración de Lp – B fueron: *Enterobacter* (2,25 a 0,10 %, $p = 0,003$) y *Pantoea* (5,33 a 0,19 %, $p = 0,011$). La abundancia de *Escherichia-Shigella* disminuyó en el período Lp – B en comparación con el período L, desde 4,00 a 2,25 % ($p = 0,023$). En la clase Alphaproteobacteria, un incremento significativo fue observado para la familia Sphingomonadaceae (*Sphingomonas*), cuando se compararon la E y la administración de Lp (0,01 a 0,06 %, $p = 0,000$), y también entre el período de WO y Lp (0,02 a 0,06 %, $p = 0,000$).

18.a.



b.



c.

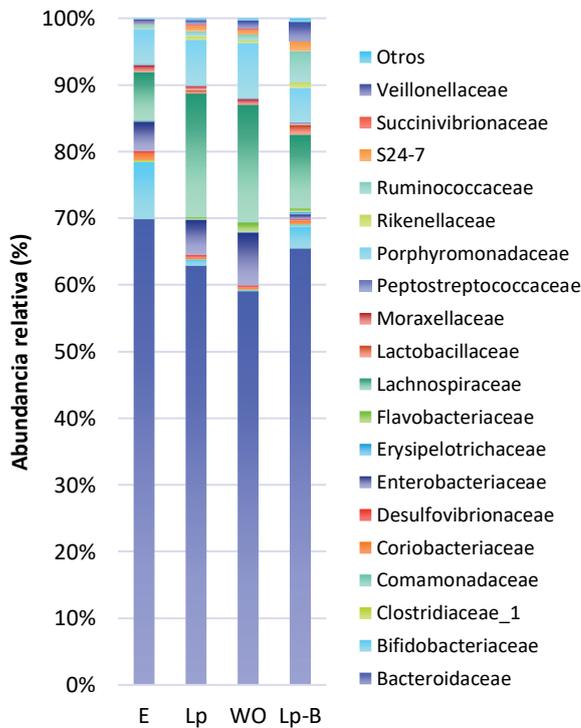


Figura 18. Cambios en la microbiota fecal de un niño obeso en el SHIME®, luego de la administración de solo *L. plantarum* 73a y en simultáneo *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. Períodos: estabilización (E), tratamiento con *L. plantarum* 73a (Lp), wash-out (Lp) y tratamiento con *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (Lp – B). Abundancia relativa del gen 16S ARNr. A nivel, **a.** Filo, **b.** Clase y **c.** Familia.

Finalmente, se realizó un gráfico NMDS con el objetivo de analizar el comportamiento de las familias a lo largo de la experiencia. El gráfico NMDS condensa información multidimensional en una representación de 2D, como la abundancia relativa de las familias, donde los puntos representan objetos. Los objetos son más similares entre sí cuanto más cercanos estén entre ellos y viceversa. En este caso, las familias ubicadas más próximas en el gráfico, se comportan en forma similar. En el gráfico NMDS de la microbiota del SHIME®, las familias presentaron un patrón similar durante todo el experimento a excepción de las siguientes: Bifidobacteriaceae, Clostridiaceae_1, Enterococcaceae y Comamonadaceae (Fig. 19). En resumen, las familias Lactobacillaceae, Nocardiaceae, Rs-D42, S24-7 y Caulobacteraceae tendieron a incrementarse entre el período de Lp y Lp – B. Aunque, las familias Ruminococcaceae, Erysipelotrichaceae, Eubacteriaceae, Veillonellaceae, Prevotellaceae y Peptostreptococcaceae solo tendieron a incrementarse cuando ambas cepas fueron administradas. Mientras que algunas familias como Desulfovibrionaceae, Moraxellaceae y Enterobacteriaceae se redujeron en el período de Lp – B. Por otro lado, el grupo de familias Sphingomonadaceae y Succinivibrionaceae parecieron incrementarse en la etapa de administración de Lp y reducirse cuando se administraron ambas cepas en simultáneo.

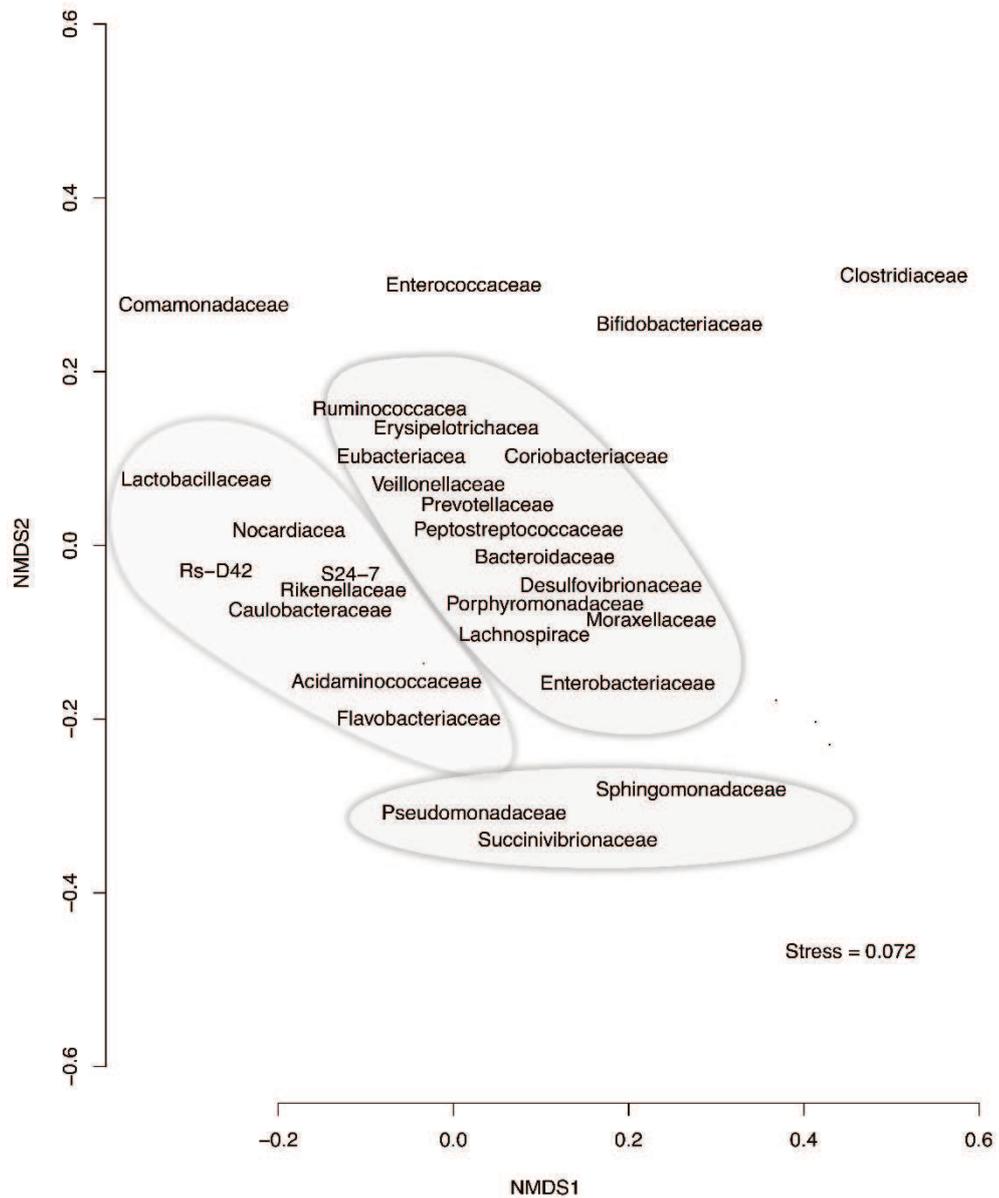


Figura 19. Gráfico NMDS (siglas en inglés de *Non-Metric Multidimensional Scaling*) de la microbiota fecal de un niño obeso en el SHIME®, a lo largo de la experiencia.

4.2 Producción de metabolitos: ion amonio y ácidos grasos de cadena corta

La concentración de NH_4^+ disminuyó significativamente cuando se administró *L. plantarum* 73a, en comparación con el período de E y cuando se administraron ambas cepas juntas, en comparación con la etapa de WO (Tabla. 9). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de AGCC durante la experiencia. En la Tabla 9 se observan los valores de los metabolitos producidos, incluyendo AGCC y NH_4^+ a lo largo de la experiencia en los reactores correspondientes al colon en el SHIME ®.

Tabla 9. Producción del ion amonio (NH_4^+) y ácidos grasos de cadena corta a lo largo de la experiencia en el SHIME ®. Períodos: estabilización (E), tratamiento con *L. plantarum* 73a (Lp), wash-out (Lp) y tratamiento con *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (Lp – B).

	NH_4^+ [mmol L ⁻¹] ¹	AGCC [mmol L ⁻¹]		
		Ácido acético ²	Ácido propiónico ¹	Ácido butírico ¹
E	26,88 ± 0,62	25,38 ± 0,81	5,52 ± 0,16	5,92 ± 4,31
Lp	24,16 ± 0,90 *	21,92 ± 2,96	6,35 ± 1,38	8,08 ± 3,08
WO	29,45 ± 0,48	29,25 ± 1,30	5,94 ± 0,76	2,56 ± 1,23
Lp – B	25,60 ± 0,77 *	27,30 ± 0,54	8,13 ± 0,64	6,17 ± 0,70

¹Análisis de ANOVA post hoc Dunnett para datos paramétricos. ²Análisis de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Se determinaron las diferencias significativas al comparar los períodos de E y L o los períodos de WO y Lp – B con un asterisco para $p < 0,05$.

Se correlacionó la abundancia relativa de las familias con la producción de metabolitos (Fig. 20). La producción de amonio presentó una correlación positiva con la familia Enterobacteriaceae (filo Proteobacteria) y una correspondencia negativa con la familia Lactobacillaceae. Los niveles de ácido acético presentaron una correlación

positiva con las familias Acidaminococcaceae (filo Firmicutes), Caulobacteraceae (filo Proteobacteria), Erysipelotrichaceae (filo Firmicutes), Eubacteriaceae (filo Firmicutes), Nocardiaceae (filo Actinobacteria) y Porphyromonadaceae (filo Bacteroidetes), y una correlación negativa con la familia Sphingomonadaceae (filo Proteobacteria). Se asoció positivamente la concentración de ácido propiónico con las familias Acidaminococcaceae, Caulobacteraceae, Nocardiaceae y Rikenellaceae (filo Bacteroidetes). Sin embargo, los niveles de ácido propiónico presentaron una correlación negativa con las familias Bifidobacteriaceae (filo Actinobacteria), Coriobacteriaceae (filo Actinobacteria), Enterococcaceae (filo Firmicutes), Peptostreptococcaceae (filo Firmicutes) y Prevotellaceae (filo Bacteroidetes). La concentración de ácido butírico, en cambio, presentó una correlación positiva con las familias Enterococcaceae y Prevotellaceae, y negativa con las familias Acidaminococcaceae, Caulobacteraceae, Nocardiaceae, Porphyromonadaceae (filo Bacteroidetes) y Rikenellaceae.

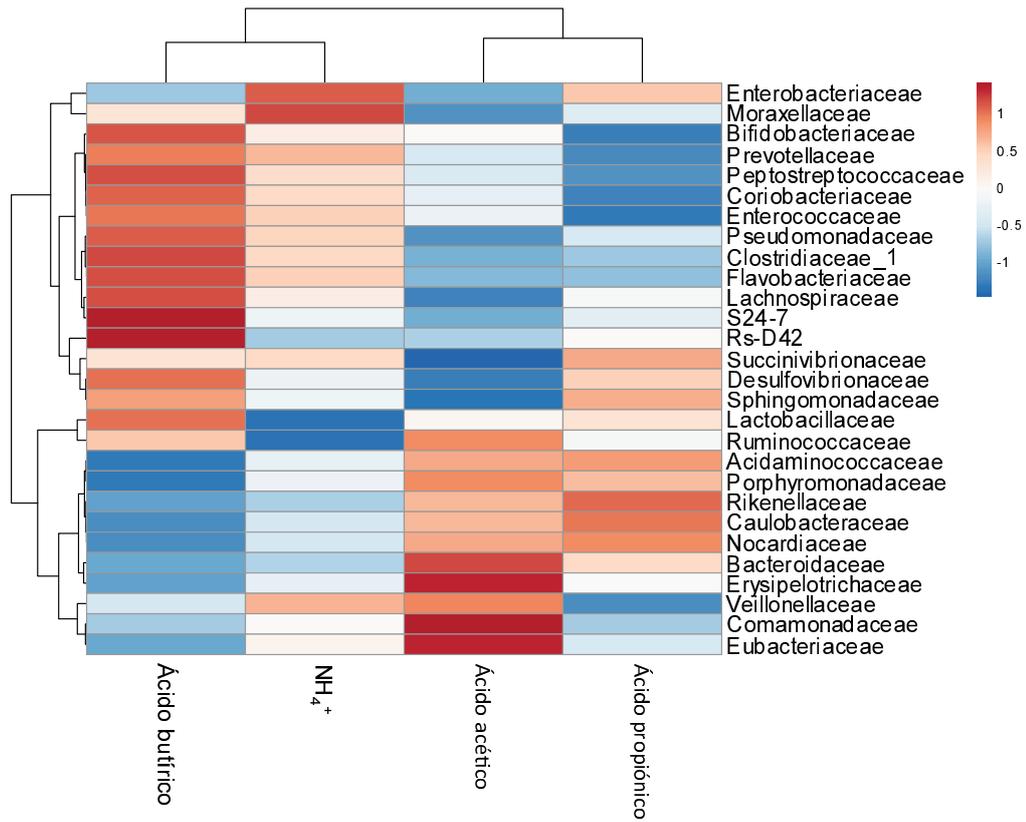


Figura 20. Correlación entre la abundancia relativa de las familias y la producción de metabolitos, tales como el ion amonio (NH₄⁺) y ácidos propiónico, butírico y acético, en la microbiota fecal de un niño obeso en el SHIME ®, luego de la administración de *L. plantarum* 73a y ambas cepas, *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

5. Discusión

La microbiota de la leche materna promueve el desarrollo correcto del sistema inmune de la mucosa intestinal y disminuye el riesgo de padecer enfermedades como la obesidad, entre otras enfermedades crónicas [112]. En aquellos casos que la lactancia se vea interrumpida o limitada, una fórmula infantil suplementada con componentes bioactivos como probióticos, prebióticos, simbióticos o postbióticos, podría mimetizar, al menos parcialmente, los beneficios de la leche materna [256]. En la actualidad, se llevaron a cabo varios estudios con probióticos, prebióticos y simbióticos, incluyendo mono- o multicepas, para restaurar o promover el adecuado funcionamiento de la microbiota intestinal en la obesidad [257]. Los probióticos, como mencionamos en la introducción, son microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio al consumidor [258]. Aunque para que un probiótico pueda ser empleado en el tratamiento o la prevención de diversas patologías requiere un estudio detallado, ya que sus efectos dependen en gran medida de la cepa y la dosis [259]. El objetivo de este capítulo fue estudiar los beneficios potenciales de la administración de la cepa *L. plantarum* 73a sola o combinada con la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en la microbiota fecal de un niño obeso, en el *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem* (SHIME ®). Para este estudio, se analizó la actividad metabólica (AGCC y NH₄⁺) de la microbiota fecal y los cambios en su composición microbiana mediante la secuenciación masiva del gen 16S ARNr.

Trabajos previos demostraron la efectividad del SHIME ® para reproducir la microbiota humana del intestino [245,260,261] y la diversidad microbiana de las tres regiones del colon con una sola muestra de materia fecal [262,263]. A lo largo de la experiencia, *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 fueron capaces de sobrevivir a las condiciones gastrointestinales del SHIME ®, tales como un pH de 2,5 en el primer reactor, simulando las condiciones ácidas del estómago, y al jugo pancreático del segundo reactor correspondiente al duodeno. En el período de estabilización (E), no se identificó ninguna de las especies administradas, sugiriendo la ausencia de estas en el inóculo fecal. La presencia de *L. plantarum* posterior al período de WO sugiere que

L. plantarum 73a fue capaz de persistir al menos una semana en los reactores del colon sin ser administrada.

Un enfoque común para analizar los cambios en la estructura microbiana es analizar la diversidad y riqueza. Cuando ambas cepas fueron administradas en simultáneo, la diversidad alfa aumentó según el índice de Shannon. Una mayor diversidad fue asociada a un normopeso y un mejor estado de salud en niños y adultos [264,265]. Méndez-Salazar y col. (2018) reportaron que niños desnutridos y con obesidad presentaban una menor diversidad que aquellos con normopeso. El consumo de azúcares, *snacks* no saludables y carbohidratos refinados fue negativamente correlacionado con los índices de Shannon y Chao1 [267]. Por ejemplo, el análisis de la microbiota intestinal de 1.135 participantes de Holanda asoció una menor diversidad microbiana a las dietas ricas en gaseosas azucaradas, el consumo de leche entera con alto contenido graso y *snacks* no saludables. En cambio, se relacionó una elevada diversidad microbiana con el consumo de frutas y vegetales, y un aumento en los niveles de lipoproteínas de alta densidad en sangre [268].

Para facilitar la interpretación de los resultados y la discusión de este capítulo, se incorporó la Figura 21 de Rinninella y col. (2019) sobre la microbiota intestinal generalmente presente en el ser humano.

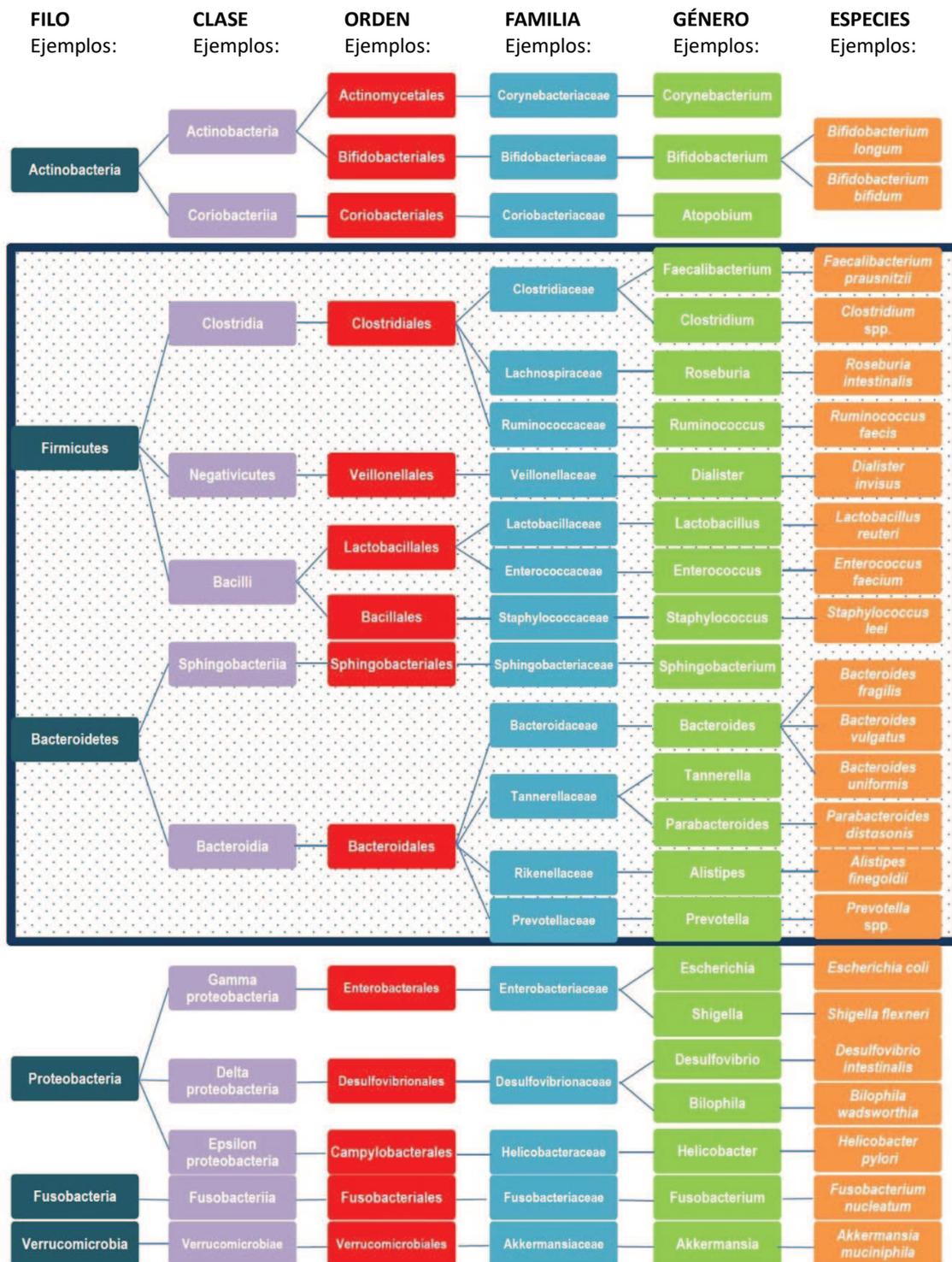


Figura 21. Ejemplos de la composición taxonómica de la microbiota intestinal. En el recuadro se citan ejemplos pertenecientes a los filos Firmicutes y Bacteroidetes que representan el 90 % de la microbiota intestinal (Figura modificada de Rinninella y col. 2019).

En este sentido, cuando los filos más abundantes de microbiota intestinal fueron estudiados en la microbiota “obesa” de ratones y humanos se observaron un aumento en la relación de Firmicutes/Bacteroidetes, en comparación con la microbiota de individuos no obesos [270,271]. Sin embargo, un metaanálisis reciente pone en duda esta primera hipótesis, ya que podría estar sesgada por un tamaño de muestra pequeño y variaciones interpersonales, entre otros [272]. Green y col. (2020) sugirieron que las diferencias observadas, entre una microbiota “obesa” y “saludable”, podrían deberse a niveles filogenéticos más específicos, como a nivel familia y especie. En nuestro estudio, los filos Firmicutes y Bacteroidetes fueron dominantes, como se menciona en otros trabajos sobre la microbiota intestinal [273]. La abundancia relativa de estos filos no presentó cambios, pero sí su estructura taxonómica, cuando ambas cepas fueron administradas al mismo tiempo, en comparación con los períodos de control (E y WO). Se modificaron filos menos abundantes como Actinobacteria y Proteobacteria. El género *Bifidobacterium* (filo Actinobacteria) disminuyó entre los períodos de WO y de E. Niveles bajos de *Bifidobacterium* fueron reportados en la microbiota fecal de obesos [243] y fueron asociados con el consumo de azúcar y *snacks* no saludables [267]. Sin embargo, se observaron resultados similares cuando se administró *L. salivarius* UCC118 Bac+ a ratones obesos con una dieta rica en grasa [274]. Asimismo, la administración de ambas cepas disminuyó el filo Proteobacteria. Algunos estudios reportaron que niños y adultos obesos presentaron un incremento de proteobacterias [266,275]. En nuestro trabajo, a lo largo de la experiencia, la composición taxonómica cambió gradualmente, y estos cambios fueron significativos desde el período de WO en adelante, es decir, luego de la administración conjunta de las cepas en estudio.

Cuando se analizó el filo Firmicutes, se observó un incremento de la familia Lactobacillaceae en el período de Lp – B, en comparación con los períodos de control (E y WO), debido principalmente a la administración de *L. plantarum* 73a. Dentro de este filo, se observaron mayores niveles de Erysipelotrichia entre los períodos de Lp y Lp – B, incremento también reportado en estudios con ratones obesos [276]. La mayor abundancia de la clase Negativicutes (filo Firmicutes), entre las etapas de administración de Lp y Lp – B, fue, además, observada en personas obesas con diabetes de tipo 2, en comparación con individuos sanos [277]. Asimismo, en nuestro estudio se observó una

reducción de *Clostridium_sensu_stricto_1* perteneciente al filo Firmicutes, en un ensayo multicéntrico, simple ciego y controlado con placebo sobre la suplementación de inulina, concluyó que la disminución de este género favoreció la pérdida de peso [278].

Dentro del filo Proteobacteria, la disminución de la familia Desulfovibrionaceae a lo largo de la experiencia parecería ser positiva, ya que en ensayos con ratones se observó un incremento de esta familia en dietas ricas en grasas [276]. Otro estudio, por ejemplo, indicó que los ratones alimentados con una dieta rica en grasa, al ser tratados con resveratrol, mejoraron no solo su perfil lipídico, la inflamación intestinal, sino también se redujo la abundancia de *Bilophila* (familia Desulfovibrionaceae) y *Ruminococcus* en la microbiota intestinal [279]. Por otro lado, la abundancia de los géneros *Enterobacter*, *Pantoea* y *Escherichia-Shigella* de la familia Enterobacteriaceae disminuyó a lo largo de la experiencia. A pesar de que varias familias de la microbiota intestinal exhiben la endotoxina LPS, miembros de Enterobacteriaceae y Desulfovibrionaceae tales como *Escherichia-Shigella* presentan una actividad 100 veces mayor que otras familias de la microbiota intestinal. Una concentración alta de LPS en plasma y una abundancia elevada de bacterias productoras de LPS fueron encontrados en personas y ratones obesos, con sobrepeso y resistentes a la insulina, por lo que podrían estar involucrados en afecciones inflamatorias dependientes de la adiposidad y la resistencia a la insulina [276,280]. Estos resultados indican que los cambios más importantes fueron en el filo Proteobacteria, y estas modificaciones podrían afectar positivamente la microbiota de niños obesos.

La microbiota intestinal, a su vez, puede interactuar con el sistema endócrino, inmunológico e inmune del huésped y viceversa, mediante producción de ciertos metabolitos como AGCC [281]. En particular, durante la obesidad, se han asociado alteraciones de los AGCC y ácidos biliares con cambios en la microbiota intestinal [282,283]. Los AGCC (ácido acético, propiónico y butírico) son productos importantes de la fermentación microbiana y presentan funciones fisiológicas diferentes, tales como favorecer la renovación celular y como fuente de energía para los colonocitos [284]. A pesar de que no se observaron diferencias significativas en AGCC, el ácido propiónico pareció incrementarse con la administración de ambas cepas. El ácido propiónico fue

reportado como un inhibidor de la inflamación intestinal y de la producción de ácidos grasos en el hígado [285]. La correlación entre la abundancia de las familias con la producción de AGCC parecieron distinguir dos patrones opuestos. Las familias Acidaminococcaceae (filo Firmicutes), Caulobacteraceae (filo Proteobacteria), Nocardiaceae (filo Actinobacteria) y Rikenellaceae (filo Bacteroidetes) parecieron favorecer la producción de ácido acético y propiónico, mientras inhibieron la producción de ácido butírico. Por el contrario, las familias Enterococcaceae (Filo Firmicutes) y Prevotellaceae (filo Bacteroidetes) favorecerían la producción de ácido butírico, mientras que inhibirían la producción de ácido propiónico. Finalmente, se asoció el incremento de ácido acético con las familias Erysipelotrichaceae y Eubacteriaceae (ambas del filo Firmicutes). Se incrementaron, en ambos tratamientos, las familias: Acidaminococcaceae, Caulobacteraceae, Nocardiaceae y Rikenellaceae. Se asoció este incremento con la producción de ácido propiónico.

El amonio es otro metabolito común de la microbiota intestinal, principalmente proveniente de la proteólisis de proteínas. Un aumento de las concentraciones de amonio está relacionado a alteraciones en el epitelio intestinal y podría favorecer la producción de tumores [286]. Una mayor actividad proteolítica es atribuida a los géneros *Bacteroides* y *Clostridium*, y los metabolitos producidos dependen del tipo y disponibilidad de sus precursores [287]. La administración de *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 disminuyó significativamente *Clostridium_sensu_stricto_1*, mientras que se incrementó la familia Lactobacillaceae. En este trabajo, la reducción de *Clostridium* y el aumento de Lactobacillaceae fue asociada con una disminución de los niveles de amonio. La administración de *L. plantarum* 73a podría reducir la producción de amonio, generalmente alta en dietas ricas en proteínas [288]. Los resultados expuestos en este capítulo coinciden con algunos ensayos clínicos en humanos que demostraron los efectos benéficos de la suplementación con cepas de lactobacilos y bifidobacterias frente a las condiciones propias del sobrepeso y la obesidad en adultos y niños [289].

6. Conclusión

L. plantarum 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 demostraron ser capaces de sobrevivir a las condiciones intestinales del SHIME[®], cuando fueron administrados en la microbiota fecal de un niño obeso. Además, *L. plantarum* 73a fue capaz de persistir después del período de lavado. La administración de las cepas combinadas incrementó la diversidad alfa, parámetro generalmente asociado a una microbiota “saludable”. El filo Proteobacteria, relacionado a condiciones inflamatorias, disminuyó con la administración de ambas cepas. La suplementación con *L. plantarum* 73a podría disminuir la producción de iones amonio, generalmente alto en dietas ricas en proteínas. Finalmente, *L. plantarum* 73a solo o combinado con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 podrían ser potenciales candidatos en estrategias complementarias para el manejo de la obesidad infantil.

Conclusiones generales

En esta tesis doctoral, se estudió la microbiota de la leche materna y se aislaron lactobacilos y bifidobacterias para su desarrollo como potenciales cultivos probióticos. A su vez, se analizaron los efectos de cepas derivadas de leche materna en la microbiota fecal de un niño obeso mediante el *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem* (SHIME®).

- La composición taxonómica de la leche materna de bebés nacidos a término y prematuros fue significativamente diferente. Al transcurrir los días, la leche materna de bebés prematuros se asemejaría, al menos parcialmente, a la leche materna de bebés a término.
- La diversidad alfa de la leche materna de los grupos a término fue mayor que la del grupo de prematuros.
- Los géneros más abundantes de la leche materna fueron *Streptococcus* y *Staphylococcus*, y estos fueron los que más contribuyeron a las diferencias observadas entre los grupos estudiados. La relación *Streptococcus/Staphylococcus* fue más abundante en las muestras de leche materna de bebés nacidos a término, en comparación con las muestras de bebés prematuros.
- El género *Rothia* (filo Actinobacteria) fue significativamente mayor en las muestras de leche materna de bebés nacidos a término en relación a bebés prematuros. El aumento de este género está asociado a una menor ocurrencia de asma.
- Se lograron aislar lactobacilos y bifidobacterias en al menos el 10 % de las muestras de leche materna analizadas. Se obtuvieron un total de 14 lactobacilos y una bifidobacteria.
- Las cepas *L. gasseri* (70a y 70c) y *L. plantarum* (73a y 73b) indujeron la mayor producción de IL-10 en co-cultivo con macrófagos murinos.

- La administración de *L. plantarum* 73a fue capaz de proteger contra una infección por *Salmonella* en un modelo murino, mediante la activación del sistema inmune del intestino delgado.
- La mayoría de las cepas aisladas, excepto *L. gallinarum*, exhibieron una sobrevivencia satisfactoria frente al proceso de liofilización y el almacenamiento a largo plazo a 5 °C, empleando lactosa o povidona como protectores.
- *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 fueron capaces de sobrevivir a las condiciones gastrointestinales del SHIME ®. En particular, *L. plantarum* 73a fue capaz de persistir durante una semana en las condiciones del SHIME ®, sin ser administrado al sistema.
- La administración de *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 aumentó la diversidad alfa de la microbiota fecal de un niño obeso en el SHIME ®.
- La administración de *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 disminuyó el filo Proteobacteria. Los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Clostridium_sensu_stricto_1* disminuyeron significativamente con la administración de ambas cepas.
- La administración de *L. plantarum* 73a disminuyó los niveles de amoníaco.

En conclusión, la leche materna presenta una microbiota única que puede ser afectada por la edad gestacional de los recién nacidos. En un futuro, serán necesarios más estudios con un número mayor de muestras para dilucidar las implicancias de las diferencias observadas. Asimismo, la leche materna fue una fuente de potenciales cultivos probióticos que podrían ayudar a mitigar patologías como la obesidad. Finalmente, en este trabajo de tesis doctoral se lograron aislar y caracterizar cepas de lactobacilos de leche materna, siendo una de las cepas caracterizadas en este trabajo objeto de un Acuerdo de Transferencia de Material Biológica con el grupo francés Pileje, firmado el 23 de Julio de 2020 (Expediente UNL REC-1029333-20) y gestionado por el Centro de Transferencia de los Resultados de Investigación (CETRI-Litoral, UNL). Este MTA tiene por objeto que se continúen los estudios de caracterización probiótica de *L.*

plantarum 73a, con vistas a un potencial licenciamiento para su aplicación y explotación comercial.

Bibliografía

- [1] WHO/OMS (2020) <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infant-and-young-child-feeding>.
- [2] J Qiao, L-J Dai, Q Zhang, Y-Q Ouyang (2020) A Meta-Analysis of the Association Between Breastfeeding and Early Childhood Obesity. *JPN* 53 57–66.
- [3] N Straub, P Grunert, K Northstone, P Emmett (2019) Economic impact of breastfeeding-associated improvements of childhood cognitive development, based on data from the ALSPAC. *BJN* 122 (s1): S16–S21.
- [4] D Garwolińska, J Namieśnik, A Kot-Wasik, W Hewelt-Belka (2018) Chemistry of Human Breast Milk—A Comprehensive Review of the Composition and Role of Milk Metabolites in Child Development. *J Agric Food Chem* 66 (45): 11881–11896.
- [5] C Castellote, R Casillas, C Ramírez-Santana, FJ Pérez-Cano, M Castell, À Franch (2011) Premature Delivery Influences the Immunological Composition of Colostrum and Transitional and Mature Human Milk. *J Nutr* 141 (6): 1181–1187.
- [6] SM Donovan, SS Comstock (2016) Human Milk Oligosaccharides Influence Neonatal Mucosal and Systemic Immunity. *Ann Nutr Metab* 69 (2): 42–51.
- [7] MAE Lawson, IJ O’Neill, M Kujawska, S Gowrinadh Javvadi, A Wijeyesekera, LJ Hall (2020) Breast milk-derived human milk oligosaccharides promote Bifidobacterium interactions within a single ecosystem. *ISME14* (2): 635–648.
- [8] K Le Doare, B Holder, A Bassett, PS Pannaraj (2018) Mother’s Milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity. *Front Immunol* 9 (FEB): 361.
- [9] MF Zacarías, A Binetti, M Laco, J Reinheimer, G Vinderola (2011) Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated

- from breast milk for use in dairy products. *Int Dairy J* 21 (8): 548–555.
- [10] A Boix-Amorós, MC Collado, A Mira (2016) Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Front Microbiol* 7 (APR): 492
- [11] P Zimmermann, N Curtis (2020) Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *J Infect.* 81 (1): 17–47.
- [12] MB Azad, T Konya, H Maughan, DS Guttman, CJ Field, AL Kozyrskyj (2013) Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ* 185 (5): 385–394.
- [13] A Bergstrom, TH Skov, MI Bahl, HM Roager, LB Christensen, TR Licht (2014) Establishment of Intestinal Microbiota during Early Life: a Longitudinal, Explorative Study of a Large Cohort of Danish Infants. *Appl Environ Microbiol* 80 (9): 2889–2900.
- [14] C Gomez-Llorente, J Plaza-Diaz, M Aguilera, S Muñoz-Quezada, M Bermudez-Brito, A Gil (2013) Three Main Factors Define Changes in Fecal Microbiota Associated With Feeding Modality in Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 57 (4): 461–466.
- [15] T Jost, C Lacroix, CP Braegger, F Rochat, C Chassard (2014) Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol* 16 (9): 2891–2904.
- [16] PF Perez, J Dore, M Leclerc, F Levenez, J Benyacoub, A Donnet-Hughes (2007) Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells *Pediatrics* 119 (3): 724–732.
- [17] R Martín, S Langa, C Reviriego, E Jiménez, ML Marín, JM Rodríguez (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 143 (6): 754–758.

-
- [18] PV Jeurink, J van Berghenhenegouwen, E Jiménez, LMJ Knippels, L Fernández, R Martín (2013) Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes* 4 (1): 17–30.
- [19] PA West, JH Hewitt, OM Murphy (1979) The Influence of Methods of Collection and Storage on the Bacteriology of Human Milk. *J Appl Bacteriol* 46 (2): 269–277.
- [20] M KUPELWIESER (1950) Bacteriology of human milk. *Osterreichische Zeitschrift Fur Kinderheilkunde Und Kinderfursorge* 4 (3–4): 343–7.
- [21] LS Dudgeon, RC Jewesbury (1924) The Bacteriology of Human Milk. *J Hyg (Lond)* 23 (1): 64–76.
- [22] A Togo, J-C Dufour, J-C Lagier, G Dubourg, D Raoult, M Million (2019) Repertoire of human breast and milk microbiota: a systematic review. *Future Microbiol* 14 (7): 623–641.
- [23] M Olivares, MP Díaz-Ropero, R Martín, JM Rodríguez, J Xaus (2006) Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 101 (1): 72–9
- [24] M Gueimonde, K Laitinen, S Salminen, E Isolauri (2007) Breast Milk: A Source of Bifidobacteria for Infant Gut Development and Maturation? *Neonatology* 92 (1): 64–66.
- [25] R Martín, E Jiménez, H Heilig, L Fernández, ML Marín, JM Rodríguez (2009) Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 75 (4): 965–969.
- [26] MP Díaz-Ropero, R Martín, S Sierra, F Lara-Villoslada, JM Rodríguez, M Olivares (2007) Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol* 102 (2): 337–343.
- [27] MP Heikkila, PEJ Saris (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the

- commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* 95 (3): 471–478.
- [28] K Murphy, D Curley, TF O’Callaghan, C-A O’Shea, EM Dempsey, C Stanton (2017) The Composition of Human Milk and Infant Faecal Microbiota Over the First Three Months of Life: A Pilot Study. *Sci Rep* 7 (1): 40597.
- [29] TL Ward, S Hosid, I Ioshikhes, I Altosaar (2013) Human milk metagenome : a functional capacity analysis. *BMC Microbiology* 13 (1): 1.
- [30] H Hermansson, H Kumar, MC Collado, S Salminen, E Isolauri, S Rautava (2019) Breast Milk Microbiota Is Shaped by Mode of Delivery and Intrapartum Antibiotic Exposure. *Front Nutr* 6: 4
- [31] S Moossavi, S Sepehri, B Robertson, L Bode, S Goruk, MB Azad (2019) Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. *Cell Host Microbe* 25 (2): 324-335.
- [32] MR Simpson, E Avershina, O Storrø, R Johnsen, K Rudi, T Øien (2018) Breastfeeding-associated microbiota in human milk following supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* La-5, and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12. *J Dairy Sci* 101 (2): 889–899.
- [33] H Tuominen, S Rautava, MC Collado, S Syrjänen, J Rautava (2018) HPV infection and bacterial microbiota in breast milk and infant oral mucosa. *PLoS One* 13 (11): e0207016.
- [34] PS Pannaraj, F Li, C Cerini, JM Bender, S Yang, GM Aldrovandi (2017) Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatrics* 171 (7): 647–654.
- [35] SH Patel, YH Vaidya, RJ Patel, RJ Pandit, CG Joshi, AP Kunjadiya (2017) Culture independent assessment of human milk microbial community in lactational mastitis. *Sci Rep* 7 (1): 1–11.
- [36] C Urbaniak, M Angelini, GB Gloor, G Reid (2016) Human milk microbiota

-
- profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome* 4 (1): 1.
- [37] V Davé, K Street, S Francis, A Bradman, L Riley, N Holland (2016) Bacterial microbiome of breast milk and child saliva from low-income Mexican-American women and children. *Pediatr Res* 79 (6): 846–854.
- [38] E Jiménez, J de Andrés, M Manrique, P Pareja-Tobes, R Tobes, JM Rodríguez (2015) Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women. *J Hum Lact* 31 (3): 406–415.
- [39] AE Magurran (2004) *Measuring Biological Diversity*. Softcover Wiley-Blackwell
- [40] XC Morgan, C Huttenhower (2012) Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLoS Comput Biol* 8 (12): e1002808.
- [41] BD Wagner, GK Grunwald, GO Zerbe, SK Mikulich-Gilbertson, CE Robertson, JK Harris (2018) On the use of diversity measures in longitudinal sequencing studies of microbial communities. *Front Microbiol* 22 (9): 1037.
- [42] S Moossavi, S Sepehri, B Robertson, L Bode, S Goruk, MB Azad (2019) Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. *Cell Host Microbe* 25 (2): 324-335.
- [43] M Toscano, R De Grandi, DG Peroni, E Grossi, V Facchin, L Drago (2017) Impact of delivery mode on the colostrum microbiota composition. *BMC Microbiology* 17 (1): 205.
- [44] H Kumar, E du Toit, A Kulkarni, J Aakko, KM Linderborg, S Salminen (2016) Distinct Patterns in Human Milk Microbiota and Fatty Acid Profiles Across Specific Geographic Locations. *Front Microbiol* 7: 1619.
- [45] C Urbaniak, A McMillan, M Angelini, GB Gloor, M Sumarah, G Reid (2014) Effect of chemotherapy on the microbiota and metabolome of human milk, a case report. *Microbiome* 2 (1): 24.

-
- [46] A Soto, V Martín, E Jiménez, I Mader, JM Rodríguez, L Fernández (2014) Lactobacilli and Bifidobacteria in Human Breast Milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 59 (1): 78–88.
- [47] R Cabrera-Rubio, MC Collado, K Laitinen, S Salminen, E Isolauri, A Mira (2012) The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* 96 (3): 544–551.
- [48] M Olivares, S Albrecht, G De Palma, MD Ferrer, G Castillejo, Y Sanz (2015) Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *Eur J Nutr* 54 (1): 119–128
- [49] R González, I Mandomando, V Fumadó, C Sacoór, E Macete, C Menendez (2013) Breast Milk and Gut Microbiota in African Mothers and Infants from an Area of High HIV Prevalence. *PLoS One* 8 (11): e80299.
- [50] S Moossavi, S Sepehri, B Robertson, L Bode, S Goruk, MB Azad (2019) Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. *Cell Host Microbe* 25 (2): 324-335.e4.
- [51] M Rajilić-Stojanović, WM de Vos (2014) The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 38 (5): 996–1047.
- [52] C Milani, S Duranti, F Bottacini, E Casey, F Turrone, M Ventura (2017) The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 81 (4): 1–67.
- [53] DB DiGiulio, R Romero, HP Amogan, JP Kusanovic, EM Bik, DA Relman (2008) Microbial Prevalence, Diversity and Abundance in Amniotic Fluid During Preterm Labor: A Molecular and Culture-Based Investigation. *PLoS One* 3 (8): e3056
- [54] K Aagaard, J Ma, KM Antony, R Ganu, J Petrosino, J Versalovic (2014) The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci Transl Med* 6 (237) : 237ra65.

-
- [55] H Wopereis, R Oozeer, K Knipping, C Belzer, J Knol (2014) The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr Allergy Immunol* 25 (5): 428–438.
- [56] M Derrien, A-S Alvarez, WM de Vos (2019) The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiol* 27 (12): 997–1010.
- [57] M Yassour, E Jason, LJ Hogstrom, TD Arthur, S Tripathi, RJ Xavier (2018) Strain-Level Analysis of Mother-to-Child Bacterial Transmission during the First Few Months of Life. *Cell Host Microbe* 24 (1): 146-154.
- [58] DM Chu, J Ma, AL Prince, KM Antony, MD Seferovic, KM Aagaard (2017) Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat Med* 23 (3): 314–326.
- [59] F Bäckhed, J Roswall, Y Peng, Q Feng, H Jia, J Wang (2015) Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 17 (5): 690–703.
- [60] S Duranti, GA Lugli, L Mancabelli, F Armanini, F Turrone, M Ventura (2017) Maternal inheritance of bifidobacterial communities and bifidophages in infants through vertical transmission. *Microbiome* 5 (1): 66.
- [61] S Wang, CA Ryan, P Boyaval, EM Dempsey, RP Ross, C Stanton (2020) Maternal Vertical Transmission Affecting Early-life Microbiota Development. *Trends in Microbiol* 28 (1): 28–45.
- [62] M Yassour, T Vatanen, H Siljander, A-M Hämäläinen, T Härkönen, RJ Xavier (2016) Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Sci Transl Med* 8 (343).
- [63] M-C Arrieta, LT Stiemsma, PA Dimitriu, L Thorson, S Russell, B Brett Finlay (2015) Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med* 7 (307): 307ra152.

-
- [64] S Salminen, B Stahl, G Vinderola, H Szajewska (2020) Infant Formula Supplemented with Biotics: Current Knowledge and Future Perspectives. *Nutrients* 12 (7): 1952.
- [65] M Tanaka, J Nakayama (2017) Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int.* 66 (4): 515–522.
- [66] D Haller (2018) *The Gut Microbiome in Health and Disease*. Springer International Publishing, Cham.
- [67] C Hill, F Guarner, G Reid, GR Gibson, DJ Merenstein, ME Sanders (2014) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11 (8): 506–514.
- [68] S Binda, C Hill, E Johansen, D Obis, B Pot, AC Ouwehand (2020) Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Front Microbiol* 11:1662.
- [69] S Arboleya, P Ruas-Madiedo, A Margolles, G Solís, S Salminen, M Gueimonde (2011) Characterization and *in vitro* properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *Int J Food Microbiol* 149 (1): 28–36.
- [70] Pendulum (2021) <https://pendulumlife.com/products/pendulum-glucose-control-2>.
- [71] F Perraudeau, P McMurdie, J Bullard, A Cheng, C Cutcliffe, O Kolterman (2020) Improvements to postprandial glucose control in subjects with type 2 diabetes: A multicenter, double blind, randomized placebo-controlled trial of a novel probiotic formulation. *BMJ Open Diabetes Res Care* 8 (1): 1–10.
- [72] RM Duar, XB Lin, J Zheng, ME Martino, T Grenier, J Walter (2017) Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Rev* 41 (1): S27–S48.

- [73] T Bintsis (2018) Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol* 4 (4): 665–684.
- [74] P Shokryazdan, M Faseleh Jahromi, JB Liang, YW Ho (2017) Probiotics: From Isolation to Application. *J Am Coll Nutr* 36 (8): 666–676.
- [75] J Zheng, S Wittouck, E Salvetti, CMAP Franz, HMB Harris, S Lebeer (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 70(4): 2782–2858.
- [76] MH Tissier (1900) Rèchèrches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourisson, University of France, 1900.
- [77] P Mattarelli, B Biavati (2018) Species in the Genus *Bifidobacterium*. B.J.B.W. Paola Mattarelli, Bruno Biavati, Wilhelm H. Holzapfel (Ed.), *Bifidobact. Relat. Org.*, Elsevier, pp. 9–48.
- [78] ND LEVINE (1975) Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E., eds. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. *The Journal of Protozoology* 22 (1): 7–7
- [79] SC Leahy, DG Higgins, GF Fitzgerald, D Sinderen (2005) Getting better with bifidobacteria. *J Appl Microbiol* 98 (6): 1303–1315
- [80] DG Hoover (2014) *Bifidobacterium*. in: *Encycl. Food Microbiol.*, Elsevier, pp. 216–222.
- [81] MJ Saez-Lara, C Gomez-Llorente, J Plaza-Diaz, A Gil (2015) The Role of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases: A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. *Biomed Res Int* 2015: 1–15.
- [82] K Halloran, MA Underwood (2019) Probiotic mechanisms of action. *Early Hum Dev* 135: 58–65.

- [83] K-Y Sun, D-H Xu, C Xie, S Plummer, J Tang, XH Ji (2017) *Lactobacillus paracasei* modulates LPS-induced inflammatory cytokine release by monocyte-macrophages via the up-regulation of negative regulators of NF-kappaB signaling in a TLR2-dependent manner. *Cytokine* 92: 1–11.
- [84] TK Hoang, B He, T Wang, DQ Tran, JM Rhoads, Y Liu (2018) Protective effect of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 against experimental necrotizing enterocolitis is mediated by Toll-like receptor 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 315(2): G231–G240.
- [85] LM Rocha-Ramírez, RA Pérez-Solano, SL Castañón-Alonso, SS Moreno Guerrero, A Ramírez Pacheco, C Eslava (2017) Probiotic *Lactobacillus* Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. *J Immunol Res* 2017:4607491.
- [86] BP Blackwood, CY Yuan, DR Wood, JD Nicolas, JS Grothaus, CJ Hunter (2017) Probiotic *Lactobacillus* Species Strengthen Intestinal Barrier Function and Tight Junction Integrity in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *J Probiotics Health* 5(1):159.
- [87] E Ermolenko, O Rybalchenko, Y Borshev, E Tarasova, T Kramskaya, A Suvorov (2018) Influence of monostrain and multistrain probiotics on immunity, intestinal ultrastructure and microbiota in experimental dysbiosis. *Benef Microbes* 9 (6): 937–949.
- [88] S-M Lim, J-J Jeong, KH Woo, MJ Han, D-H Kim (2016) *Lactobacillus sakei* OK67 ameliorates high-fat diet-induced blood glucose intolerance and obesity in mice by inhibiting gut microbiota lipopolysaccharide production and inducing colon tight junction protein expression. *Nutr Res* 36 (4): 337–348.
- [89] T Didari, S Solki, S Mozaffari, S Nikfar, M Abdollahi (2014) A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin Drug Saf* 13 (2): 227–239.
- [90] J Maldonado, F Lara-Villoslada, S Sierra, L Sempere, M Gómez, M Olivares (2010) Safety and tolerance of the human milk probiotic strain *Lactobacillus salivarius*

- CECT5713 in 6-month-old children. *Nutrition* 26 (11–12): 1082–1087.
- [91] P Burns, J Alard, J Hrdý, D Boutillier, R Páez, C Grangette (2017) Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice. *Sci Rep* 7 (1): 43211.
- [92] S Jara, M Sánchez, R Vera, J Cofré, E Castro (2011) The inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin. *Anaerobe* 17 (6): 474–477.
- [93] A Lyons, D O'Mahony, F O'Brien, J MacSharry, B Sheil, L O'Mahony (2010) Bacterial strain-specific induction of Foxp3 + T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clin Exp Allergy* 40(5):811-819.
- [94] H Pabst, D Spady, L Pilarski, M Carson, J Beeler, M Krezolek (1997) Differential modulation of the immune response by breast- or formula-feeding of infants. *Acta Paediatrica* 86 (12): 1291–1297
- [95] M Saarela, I Virkajärvi, H-L Alakomi, P Sigvart-Mattila, J Mättö (2006) Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal* 16 (12): 1477–1482
- [96] EA Trush, EA Poluektova, AG Beniashvili, OS Shifrin, YM Poluektov, VT Ivashkin (2020) The Evolution of Human Probiotics: Challenges and Prospects. *Probiotics Antimicrob Proteins* 12 (4): 1291–1299.
- [97] L Drago, E De Vecchi, A Gabrieli, R De Grandi, M Toscano (2015) Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus salivarius* LS01 and *Bifidobacterium breve* BR03, Alone and in Combination, on Peripheral Blood Mononuclear Cells of Allergic Asthmatics. *Allergy Asthma Immunol Res* 7 (4): 409 - 413.
- [98] CMC Chapman, GR Gibson, I Rowland (2012) *In vitro* evaluation of single- and multi-strain probiotics: Inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens. *Anaerobe* 18 (4): 405–413.

-
- [99] B Vitali, M Candela, D Matteuzzi, P Brigidi (2003) Quantitative Detection of Probiotic *Bifidobacterium* Strains in Bacterial Mixtures by Using Real-time PCR. *Syst Appl Microbiol* 26 (2): 269–276.
- [100] M Mikelsaar, V Lazar, A Onderdonk, G Donelli (2011) Do probiotic preparations for humans really have efficacy? *Microbial Ecology in Health and Disease* 22 (1): 10128.
- [101] MJ Salas-Jara, A Ilabaca, M Vega, A García (2016) Biofilm Forming *Lactobacillus*: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms* 4 (3): 35.
- [102] KCH van der Ark, ADW Nugroho, C Berton-Carabin, C Wang, C Belzer, K Schroen (2017) Encapsulation of the therapeutic microbe *Akkermansia muciniphila* in a double emulsion enhances survival in simulated gastric conditions. *Food Res Int* 102: 372–379.
- [103] C-J Chang, T-L Lin, Y-L Tsai, T-R Wu, W-F Lai, H-C Lai (2019) Next generation probiotics in disease amelioration. *J Food Drug Anal* 27 (3): 615–622.
- [104] N Piqué, M Berlanga, D Miñana-Galbis (2019) Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: An overview. *Int J Mol Sci* 20 (10): 2534.
- [105] MC Collado, G Vinderola, S Salminen (2019) Postbiotics: facts and open questions. A position paper on the need for a consensus definition. *Benef Microbes* 10 (7): 711–719.
- [106] H Plovier, A Everard, C Druart, C Depommier, M Van Hul, PD Cani (2017) A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 23 (1): 107–113.
- [107] A Everard, C Belzer, L Geurts, JP Ouwerkerk, C Druart, PD Cani (2013) Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (22): 9066–9071.

-
- [108] S Tamburini, N Shen, HC Wu, JC Clemente (2016) The microbiome in early life: Implications for health outcomes. *Nat Med* 22 (7): 713–722.
- [109] K Miliku, M Azad (2018) Breastfeeding and the Developmental Origins of Asthma: Current Evidence, Possible Mechanisms, and Future Research Priorities. *Nutrients* 10 (8): 995.
- [110] WD Barfield (2018) Public Health Implications of Very Preterm Birth. *Clin Perinatol* 45 (3): 565–577.
- [111] S Unger, A Stintzi, P Shah, D Mack, DL O'Connor (2015) Gut microbiota of the very-low-birth-weight infant. *Pediatr Res* 77 (1–2): 205–213.
- [112] KE Lyons, CA Ryan, EM Dempsey, RP Ross, C Stanton (2020) Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients* 12 (4): 1039.
- [113] C Lau (2018) Breastfeeding Challenges and the Preterm Mother-Infant Dyad: A Conceptual Model. *Breastfeed Med* 13 (1): 8–17
- [114] J Bauer, J Gerss (2011) Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clin Nutr* 30 (2): 215–220.
- [115] R Logares (2017) ramalok/amplicon_processing: Workflow for Analysing MiSeq Amplicons based on Uparse.
- [116] S Nurk, A Bankevich, D Antipov, AA Gurevich, A Korobeynikov, PA Pevzner (2013) Assembling Single-Cell Genomes and Mini-Metagenomes From Chimeric MDA Products. *J Comput Biol* 20 (10): 714–737.
- [117] SI Nikolenko, AI Korobeynikov, MA Alekseyev (2013) BayesHammer: Bayesian clustering for error correction in single-cell sequencing. *BMC Genomics* 14 (1): S7.
- [118] RC Edgar, H Flyvbjerg (2015) Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics* 31 (21): 3476–3482.

-
- [119] RC Edgar (2016) UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *BioRxiv*.
- [120] RC Edgar (2018) Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics* 34 (14): 2371–2375.
- [121] BJ Callahan, K Sankaran, JA Fukuyama, PJ McMurdie, SP Holmes (2016) Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Res* 5: 1492.
- [122] SF Altschul, W Gish, W Miller, EW Myers, DJ Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215 (3): 403–410.
- [123] RC Edgar, H Flyvbjerg (2015) Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics* 31 (21): 3476–3482.
- [124] CE Shannon (1948) A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal* 27 (3): 379–423.
- [125] EH Simpson (1949) Measurement of Diversity. *Nature* 163 (4148): 688.
- [126] JB Hughes, JJ Hellmann, TH Ricketts, BJM Bohannan (2001) Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl Environ Microbiol* 67 (10): 4399–4406.
- [127] Ø Hammer, DAT Harper, P. Ryan (2001) PAST: Paleontological statistics *software* package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1): 9.
- [128] MW Kemp, JP Newnham, JG Challis, AH Jobe, SJ Stock (2015) The clinical use of corticosteroids in pregnancy. *Human Reproduction Update*.
- [129] K Fehr, S Moossavi, H Sbihi, RCT Boutin, L Bode, MB Azad (2020) Breastmilk Feeding Practices Are Associated with the Co-Occurrence of Bacteria in Mothers' Milk and the Infant Gut: the CHILD Cohort Study. *Cell Host Microbe* 28 (2): 285–297.

-
- [130] MR Asbury, J Butcher, JK Copeland, S Unger, N Bando, DL O'Connor (2020) Mothers of Preterm Infants Have Individualized Breast Milk Microbiota that Changes Temporally Based on Maternal Characteristics. *Cell Host Microbe* 1–14.
- [131] QS Damaceno, JP Souza, JR Nicoli, RL Paula, GB Assis, FS Martins (2017) Evaluation of Potential Probiotics Isolated from Human Milk and Colostrum. *Probiotics Antimicrob Proteins* 9 (4): 371–379.
- [132] JL Fitzstevens, KC Smith, JI Hagadorn, MJ Caimano, AP Matson, EA Brownell (2017) Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr Clin Pract* 32 (3): 354–364.
- [133] H Kumar, E du Toit, A Kulkarni, J Aakko, KM Linderborg, S Salminen (2016) Distinct Patterns in Human Milk Microbiota and Fatty Acid Profiles Across Specific Geographic Locations. *Front Microbiol* 7:1619.
- [134] A Ojo-Okunola, M Nicol, E du Toit (2018) Human Breast Milk Bacteriome in Health and Disease. *Nutrients* 10 (11): 1643.
- [135] MC Collado, K Laitinen, S Salminen, E Isolauri (2012) Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk. *Pediatr Res* 72 (1): 77–85.
- [136] KM Hunt, JA Foster, LJ Forney, UME Schütte, DL Beck, MA McGuire (2011) Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One* 6 (6): 1–8.
- [137] E Jiménez, J de Andrés, M Manrique, P Pareja-Tobes, R Tobes, JM Rodríguez (2015) Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women. *J Hum Lact* 31 (3): 406–415.
- [138] H Soeorg, HK Metsvaht, EE Keränen, I Eelmäe, M Merila, I Lutsar (2019) Genetic Relatedness of *Staphylococcus haemolyticus* in Gut and Skin of Preterm Neonates and Breast Milk of Their Mothers. *Pediatr Infect Dis J* 38 (3): 308–313.

-
- [139] T Jost, C Lacroix, C Braegger, C Chas.sard (2013) Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br J Nutr* 110 (7): 1253–1262.
- [140] MR Simpson, E Avershina, O Storrø, R Johnsen, K Rudi, T Øien (2018) Breastfeeding-associated microbiota in human milk following supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* La-5, and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12. *J Dairy Sci* 101 (2): 889–899.
- [141] SW Li, K Watanabe, CC Hsu, SH Chao, ZH Yang, YC Tsai (2017) Bacterial composition and diversity in breast milk samples from mothers living in Taiwan and Mainland China. *Front Microbiol* 8:965.
- [142] JE Williams, JM Carrothers, KA Lackey, NF Beatty, MA York, MK McGuire (2017) Human Milk Microbial Community Structure Is Relatively Stable and Related to Variations in Macronutrient and Micronutrient Intakes in Healthy Lactating Women. *J Nutr* 147 (9): 1739–1748.
- [143] WA Walker, RS Iyengar (2015) Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatr Res* 77 (1–2): 220–228.
- [144] M Olivares, MP Díaz-Roperó, N Gómez, F Lara-Villoslada, S Sierra, J Xaus (2006) Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *Int J Food Microbiol* 107 (2): 104–111.
- [145] JA Maldonado-Lobón, M Gil-Campos, J Maldonado, E López-Huertas, K Flores-Rojas, M Olivares (2015) Long-term safety of early consumption of *Lactobacillus fermentum* CECT5716: A 3-year follow-up of a randomized controlled trial. *Pharmacol Res* 95–96 12–19.
- [146] K Kordy, T Gaufin, M Mwangi, F Li, C Cerini, GM Aldrovandi (2020) Contributions to human breast milk microbiome and enteromammary transfer of *Bifidobacterium breve*. *PLoS One* 15 (1): 1–10.

-
- [147] K Korpela, EW Blakstad, SJ Moltu, K Strømmen, B Nakstad, W de Vos (2018) Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Sci Rep* 8 (1): 2453.
- [148] Y Wang, JD Hoenig, KJ Malin, S Qamar, EO Petrof, EC Claud (2009) 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME* 3 (8): 944–954.
- [149] MF Weems, NR Dereddy, SR Arnold (2015) Mother’s Milk as a Source of *Enterobacter cloacae* Sepsis in a Preterm Infant. *Breastfeed Med* 10 (10): 503–504.
- [150] G Biesbroek, AATM Bosch, X Wang, BJJ Keijser, RH Veenhoven, D Bogaert (2014) The Impact of Breastfeeding on Nasopharyngeal Microbial Communities in Infants. *Am J Respir Crit Care Med* 190 (3): 298-308.
- [151] C Urbaniak, A McMillan, M Angelini, GB Gloor, M Sumarah, G Reid (2014) Effect of chemotherapy on the microbiota and metabolome of human milk, a case report. *Microbiome* 2 (24): 1-11.
- [152] DA Gidrewicz, TR Fenton (2014) A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatrics* 14 (1): 216.
- [153] P Khodayar-Pardo, L Mira-Pascual, MC Collado, C Martínez-Costa (2014) Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *J Perinatol* 34 (8): 599–605.
- [154] L Moles, E Escribano, J de Andrés, MT Montes, JM Rodríguez, I Espinosa-Martos (2015) Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, Two Strains Isolated from Human Milk, to Very Low and Extremely Low Birth Weight Preterm Infants: A Pilot Study. *J Immunol Res* 2015: 1–12.
- [155] S Moossavi, S Sepehri, B Robertson, L Bode, S Goruk, MB Azad (2019) Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. *Cell Host Microbe* 25 (2): 324-335.

-
- [156] WA Walker, RS Iyengar (2015) Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatr Res* 77 (1–2): 220–228.
- [157] WH Oddy (2017) Breastfeeding, Childhood Asthma, and Allergic Disease. *Ann Nutr Metab* 70: 26–36.
- [158] HM Timmerman, NBMM Rutten, J Boekhorst, DM Saulnier, GAM Kortman, GT Rijkers (2017) Intestinal colonisation patterns in breastfed and formula-fed infants during the first 12 weeks of life reveal sequential microbiota signatures. *Sci Rep* 7 (1): 8327.
- [159] F Yasmin, HM Tun, TB Konya, DS Guttman, RS Chari, MR Sears (2017) Cesarean Section, Formula Feeding, and Infant Antibiotic Exposure: Separate and Combined Impacts on Gut Microbial Changes in Later Infancy. *Front Pediatr* 5 (200): 1-13.
- [160] G Solís, CG de Los Reyes-Gavilan, N Fernández, A Margolles, M Gueimonde (2010) Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* 16 (3): 307–10.
- [161] J Sun, G Marwah, M Westgarth, N Buys, D Ellwood, PH Gray (2017) Effects of Probiotics on Necrotizing Enterocolitis, Sepsis, Intraventricular Hemorrhage, Mortality, Length of Hospital Stay, and Weight Gain in Very Preterm Infants: A Meta-Analysis. *Adv Nutr* 8 (5): 749–763.
- [162] C Gómez-Gallego, JM Morales, D Monleón, E du Toit, H Kumar, MC Collado (2018) Human breast milk NMR metabolomic profile across specific geographical locations and its association with the milk microbiota. *Nutrients* 10 (10):1355.
- [163] W Sybesma, R Kort, YK Lee (2015) Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? *Trends Biotechnol* 33 (4): 197–200.
- [164] M Gueimonde, S Salminen (2006) New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease* 38: S242–S247.

-
- [165] M Gil-Campos, MÁ López, MV Rodríguez-Benítez, J Romero, I Roncero, M Olivares (2012) *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1-6 months of age: A Randomized Controlled Trial. *Pharmacol Res* 65 (2): 231–238.
- [166] G Athalye-Jape, S Rao, S Patole (2016) *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 as a Probiotic for Preterm Neonates. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 40 (6): 783–794.
- [167] MF Zacarías, TC Souza, N Zaburlín, D Carmona Cara, J Reinheimer, G Vinderola (2017) Influence of Technological Treatments on the Functionality of *Bifidobacterium lactis* INL1, a Breast Milk-Derived Probiotic. *J Food Sci* 82 (10): 2462–2470.
- [168] U Edwards, T Rogall, H Blöcker, M Emde, EC Böttger (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 17 (19): 7843–7853.
- [169] J Sambrook, DW Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. in: Cold Spring Harb. Lab. Press, 3rd ed., CSHL Press, Nueva York, EEUU, p. 2344.
- [170] SF Altschul, W Gish, W Miller, EW Myers, DJ Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215 (3): 403–410.
- [171] AG Binetti, VB Suárez, P Tailliez, JA Reinheimer (2007) Characterization of spontaneous phage-resistant variants of *Streptococcus thermophilus* by randomly amplified polymorphic DNA analysis and identification of phage-resistance mechanisms. *International Dairy Journal* 17 (9): 1115–1122.
- [172] G Giraffa, C Andrighetto, C Antonello, M Gatti, C Lazzi, E Neviani (2004) Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin. *Int J Food Microbiol* 91 (2): 129–139.
- [173] HC Romesburg (1984) *Cluster Analysis for Researchers*. Lifetime Learning Publications, Belmont, EEUU.

-
- [174] CG Vinderola, M Medici, G Perdigón (2004) Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *J Appl Microbiol* 96 (2): 230–43.
- [175] AL Jorjão, FE de Oliveira, MVP Leão, CAT Carvalho, AOC Jorge, LD de Oliveira (2015) Live and Heat-Killed *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 May Induce Modulatory Cytokines Profiles on Macrophages RAW 264.7. *The Scientific World Journal* 2015 1–6.
- [176] J Charan, N Kantharia (2013) How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 4 (4): 303
- [177] G Vinderola, C Matar, G Perdigón (2007) Milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium infection in mice. *Immunobiology* 212 (2): 107–18.
- [178] C Ferrario, V Taverniti, C Milani, W Fiore, M Laureati, S Guglielmetti (2014) Modulation of Fecal Clostridiales Bacteria and Butyrate by Probiotic Intervention with *Lactobacillus paracasei* DG Varies among Healthy Adults. *J Nutr* 144 (11): 1787–1796.
- [179] MH Saarela, H-L Alakomi, A Puhakka, J Mättö (2009) Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of *in vitro* analyses of cell physiological functions to predict it. *J Appl Microbiol* 106 (4): 1204–1212.
- [180] D Bates, M Mächler, B Bolker, S Walker (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* 67 (1).
- [181] R team (2017) R: A language and environment for statistical computing.
- [182] R V. Lenth (2009) Response-Surface Methods in R, Using rsm. *Journal of Statistical Software* 32 (7): 1–17.

- [183] JK Kaushik, A Kumar, RK Duary, AK Mohanty, S Grover, VK Batish (2009) Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PLoS One* 4 (12).
- [184] T Dhewa, V Bajpai, RK Saxena, S Pant, V Mishra (2010) Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics on basis of *in vitro* attributes. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 5 (1): 45–51.
- [185] A Jofré, T Aymerich, M Garriga (2015) Impact of different cryoprotectants on the survival of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei/paracasei* during long-term storage. *Benef Microbes* 6 (3): 381–386.
- [186] DI Lewis (2019) Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs. *Emerging Topics in Life Sciences* 3 (6): 675–679.
- [187] W Sybesma, R Kort, YK Lee (2015) Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? *Trends Biotechnol* 33 (4): 197–200.
- [188] RG Aswathy, B Ismail, RP John, KM Nampoothiri (2008) Evaluation of the Probiotic Characteristics of Newly Isolated Lactic Acid Bacteria. *App Biochem Biotechnol* 151 (2–3): 244–255.
- [189] N Awasti, SK Tomar, SD Pophaly, Poonam, VK Lule, S Anand (2016) Probiotic and functional characterization of bifidobacteria of Indian human origin. *J Appl Microbiol* 120 (4): 1021–1032.
- [190] N Rokana, BP Singh, N Thakur, C Sharma, RD Gulhane, H Panwar (2018) Screening of cell surface properties of potential probiotic lactobacilli isolated from human milk. *Journal of Dairy Research* 85 (3): 347–354.
- [191] M Gotteland, MJ Cires, C Carvalho, N Vega, MA Ramirez, G Figueroa (2014) Probiotic Screening and Safety Evaluation of *Lactobacillus* Strains from Plants, Artisanal Goat Cheese, Human Stools, and Breast Milk. *J Med Food* 17 (4): 487–495.
- [192] NA Reis, MAF Saraiva, EAA Duarte, EA de Carvalho, BB Vieira, NS Evangelista-

- Barreto (2016) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk. *J Appl Microbiol* 121 (3): 811–820
- [193] QS Damaceno, JP Souza, JR Nicoli, RL Paula, GB Assis, FS Martins (2017) Evaluation of Potential Probiotics Isolated from Human Milk and Colostrum. *Probiotics Antimicrob Proteins* 9 (4): 371–379.
- [194] M Jiang, F Zhang, C Wan, Y Xiong, NP Shah, X Tao (2016) Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *J Dairy Sci* 99 (3): 1736–1746.
- [195] K K., C D., S-D R., K T. (2015) Characterization of bacterial isolates from the Microbiota of mothers' breast milk and their infants. *Gut Microbes* 6 (6): 341–351.
- [196] Z Hassan, S Mustafa, RA Rahim, NM Isa (2016) Anti-breast cancer effects of live, heat-killed and cytoplasmic fractions of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus hominis* isolated from human breast milk. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 52 (3): 337–348.
- [197] M Eshaghi, MH Bibalan, M Rohani, M Esghaei, M Douraghi, MR Pourshafie (2017) *Bifidobacterium* obtained from mother's milk and their infant stool. A comparative genotyping and antibacterial analysis. *Microb Pathog* 111 94–98.
- [198] F Mohammadi, M Eshaghi, S Razavi, DD Sarokhalil, M Talebi, MR Pourshafie (2018) Characterization of bacteriocin production in *Lactobacillus* spp. isolated from mother's milk. *Microb Pathog* 111: 94-97
- [199] P-W Chen, Y-L Lin, M-S Huang (2018) Profiles of commensal and opportunistic bacteria in human milk from healthy donors in Taiwan. *J Food Drug Anal* 26 (4): 1235–1244
- [200] X Jiao, M-D Fu, Y-Y Wang, J Xue, Y Zhang (2020) *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* for preventing necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight preterm infants: a systematic review and meta-analysis. *World J Pediatr* 16 (2): 135–142

-
- [201] L Fernández, S Langa, V Martín, A Maldonado, E Jiménez, JM Rodríguez (2013) The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 69 (1): 1–10.
- [202] MK McGuire, MA McGuire (2015) Human milk: mother nature's prototypical probiotic food? *Adv Nutr* 6 (1): 112–23.
- [203] JM Neal-McKinney, X Lu, T Duong, CL Larson, DR Call, ME Konkel (2012) Production of Organic Acids by Probiotic Lactobacilli Can Be Used to Reduce Pathogen Load in Poultry. *PLoS One* 7 (9): e43928.
- [204] MC Collado, I Surono, J Meriluoto, S Salminen (2007) Indigenous Dadih Lactic Acid Bacteria: Cell-Surface Properties and Interactions with Pathogens. *J Food Sci* 72 (3): M89–M93.
- [205] G Vinderola, M Gueimonde, C Gomez-Gallego, L Delfederico, S Salminen (2017) Correlation between *in vitro* and *in vivo* assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. *Trends Food Sci Technol* 68: 83–90.
- [206] MAK Azad, M Sarker, D Wan (2018) Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *Biomed Res Int* 2018 (8063647): 1–10.
- [207] F Lara-Villoslada, M Olivares, S Sierra, J Miguel Rodríguez, J Boza, J Xaus (2007) Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr* 98 (S1): S96–S100.
- [208] J Uberos, E Aguilera-Rodríguez, A Jerez-Calero, M Molina-Oya, A Molina-Carballo, E Narbona-López (2017) Probiotics to prevent necrotising enterocolitis and nosocomial infection in very low birth weight preterm infants. *The Br J Nutr* 117 (7): 994–1000.
- [209] J Plaza-Díaz, FJ Ruiz-Ojeda, M Gil-Campos, A Gil (2019) Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr* 10: S49–S66.
- [210] M Botes, B Loos, CA van Reenen, LMT Dicks (2008) Adhesion of the probiotic

- strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Arch Microbiol* 190 (5): 573–84.
- [211] G Broeckx, D Vandenneuvel, IJJ Claes, S Lebeer, F Kiekens (2016) Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm* 505 (1–2): 303–18.
- [212] Z Hubálek (2003) Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46 (3): 205–229.
- [213] PB Conrad, DP Miller, PR Cielenski, JJ de Pablo (2000) Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology* 41 (1): 17–24.
- [214] XC Meng, C Stanton, GF Fitzgerald, C Daly, RP Ross (2008) Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem* 106 (4): 1406–1416.
- [215] M Rogosa, JG Franklin, KD Perry (1961) Correlation of the Vitamin Requirements with Cultural and Biochemical Characters of *Lactobacillus* spp. *J Gen Microbiol* 25 (3): 473–482.
- [216] ML Bulatović, MB Rakin, MS Vukašinović-Sekulić, L V. Mojović, TŽ Krunic (2014) Effect of nutrient supplements on growth and viability of *Lactobacillus johnsonii* NRRL B-2178 in whey. *International Dairy Journal* 34 (1): 109–115.
- [217] Z Dong, L Gu, J Zhang, M Wang, G Du, H Li (2014) Optimisation for high cell density cultivation of *Lactobacillus salivarius* BBE 09-18 with response surface methodology. *International Dairy Journal* 34 (2): 230–236.
- [218] SL Liew, AB Ariff, AR Raha, YW Ho (2005) Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. *Int J Food Microbiol* 102 (2): 137–142.
- [219] B Liu, M Yang, B Qi, X Chen, Z Su, Y Wan (2010) Optimizing L-(+)-lactic acid

- production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. *Biochem Eng J* 52 (2–3): 212–219.
- [220] K Arakawa, K Matsunaga, S Takihiro, A Moritoki, S Ryuto, T Miyamoto (2015) *Lactobacillus gasseri* requires peptides, not proteins or free amino acids, for growth in milk. *J Dairy Sci* 98 (3): 1593–1603.
- [221] C Ma, G Cheng, Z Liu, G Gong, Z Chen (2016) Determination of the essential nutrients required for milk fermentation by *Lactobacillus plantarum*. *LWT Food Sci Technol* 65: 884–889.
- [222] J Liu, Z Gu, W Lu, D Hu, X Zhao, W Chen (2018) Multiple mechanisms applied by: *Lactobacillus pentosus* AT6 to mute the lethal effects of Salmonella in a mouse model. *Food Funct* 9 (5): 2787–2795.
- [223] SAJ Schmidt, S Lo, LM Hollestein (2018) Research Techniques Made Simple: Sample Size Estimation and Power Calculation. *J Invest Dermatol* 138 (8): 1678–1682.
- [224] R Santaolalla, M Fukata, MT Abreu (2011) Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 27 (2): 125–131.
- [225] CD Garner, DA Antonopoulos, B Wagner, GE Duhamel, I Keresztes, C Altier (2009) Perturbation of the Small Intestine Microbial Ecology by Streptomycin Alters Pathology in a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Murine Model of Infection. *Infect Immun* 77 (7): 2691–2702.
- [226] JM Wells, RJ Brummer, M Derrien, TT MacDonald, F Troost, CL Garcia-Rodenas (2017) Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 312 (3): G171–G193.
- [227] L Eckmann, MF Kagnoff (2001) Cytokines in host defense against *Salmonella*. *Microbes Infect* 3 (14–15): 1191–1200.
- [228] S Bao, KW Beagley, MP France, J Shen, AJ Husband (2000) Interferon-gamma

- plays a critical role in intestinal immunity against *Salmonella* Typhimurium infection. *Immunology* 99 (3): 464–472.
- [229] T Tanaka, M Narazaki, K Masuda, T Kishimoto (2016) Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 941 79–88.
- [230] C Andrews, MH McLean, SK Durum (2018) Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function. *Front Immunol* 9 (1270): 1-15.
- [231] MF Zacarías, J Reinheimer, L Forzani, C Grangette, G Vinderola (2014) Mortality and translocation assay to study the protective capacity of *Bifidobacterium lactis* INL1 against *Salmonella* Typhimurium infection in mice. *Benef Microbes* 5 (4): 427–436.
- [232] A Tomova, I Bukovsky, E Rembert, W Yonas, J Alwarith, H Kahleova (2019) The effects of vegetarian and vegan diets on gut microbiota. *Front Nutr.*
- [233] C Chen, Y Lu, H Yu, Z Chen, H Tian (2019) Influence of 4 lactic acid bacteria on the flavor profile of fermented apple juice. *Food Biosci* 27 (2018): 30–36.
- [234] Organización Mundial de la salud (2020) Sobrepeso y obesidad infantiles.
- [235] M Sanchez, S Panahi, A Tremblay (2015) Childhood obesity: A role for gut microbiota? *Int J Environ Res Public Health* 12 (1): 162–175.
- [236] S Kumar, AS Kelly (2017) Review of Childhood Obesity. *May Clin Proc* 92 (2): 251–265.
- [237] E Isolauri (2017) Microbiota and Obesity. *Nestle Nutr Inst Workshop* 88: 95-105.
- [238] P Friis, CE Fonviihl, Ag, T Stjernholm, T Hansen, O Pedersen, J-C Holm (2016) The Role of the Gut Microbiota in Childhood Obesity. *Child Obes* 12 (4): 292–299.
- [239] E Isolauri, S Salminen, S Rautava (2016) Early Microbe Contact and Obesity Risk: Evidence Of Causality? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 63 (1): S3–S5.
- [240] PD Cani, S Possemiers, T Van De Wiele, Y Guiot, A Everard, NM Delzenne (2009)

- Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2- driven improvement of gut permeability. *Gut* 58 (8): 1091-1103
- [241] BS Sivamaruthi, P Kesika, N Suganthy, C Chaiyasut (2019) A Review on Role of Microbiome in Obesity and Antiobesity Properties of Probiotic Supplements. *Biomed Res Int* 2019(9): 3291367.
- [242] B Yang, KY Hur, M Lee (2017) Alterations in Gut Microbiota and Immunity by Dietary Fat. *Yonsei Med J* 58 (6): 1083.
- [243] S Nagata, Y Chiba, C Wang, Y Yamashiro (2017) The effects of the *Lactobacillus casei* strain on obesity in children: a pilot study. *Benef Microbes* 8 (4): 535–543.
- [244] F Famouri, Z Shariat, M Hashemipour, M Keikha, R Kelishadi (2017) Effects of Probiotics on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Obese Children and Adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 64 (3): 413–417.
- [245] S Possemiers, K Verthé, S Uyttendaele, W Verstraete (2004) PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* 49 (3): 495–507
- [246] K Sivieri, MLV Morales, MAT Adorno, IK Sakamoto, SMI Saad, EA Rossi (2013) *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 improved “gut health” in the SHIME® reactor. *BMC Gastroenterol* 13 (100): 1-9.
- [247] F Bianchi, N Larsen, T de Mello Tieghi, MA Tallatico Adorno, W Kot, K Sivieri (2018) Modulation of gut microbiota from obese individuals by *in vitro* fermentation of citrus pectin in combination with *Bifidobacterium longum* BB-46. *App Microbiol Biotechnol* 102 (20): 8827–8840.
- [248] S Oddi, A Binetti, P Burns, A Cuatrin, J Reinheimer, G Vinderola (2020) Occurrence of bacteria with technological and probiotic potential in Argentinian human breast-milk. *Benef Microbes* 11 (7): 685 - 702.

-
- [249] K Molly, M Vande Woestyne, I De Smet, W Verstraete (1994) Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism-associated activities. *Microbial Ecology in Health and Disease* 7 (4): 191–200.
- [250] MAT Adorno, JS Hirasawa, MBA Varesche (2014) Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). *American Journal of Analytical Chemistry* 05 (07): 406–414.
- [251] AP Christoff, AFR Sereia, DR Boberg, RLV Moraes, LFV Oliveira (2017) Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. *White Paper: Bacterial NGS Sequencing*.
- [252] Y Wang, P-Y Qian (2009) Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS One* 4 (10): e7401.
- [253] JG Caporaso, CL Lauber, WA Walters, D Berg-Lyons, CA Lozupone, R Knight (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (1): 4516–4522.
- [254] T Metsalu, J Vilo (2015) ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res* 43 (W1): W566–W570.
- [255] IBM (2013) IBM SPSS Statistics for Windows.
- [256] S Salminen, B Stahl, G Vinderola, H Szajewska (2020) Infant Formula Supplemented with Biotics: Current Knowledge and Future Perspectives. *Nutrients* 12 (7) : 1952.
- [257] S Tavares da Silva, C Araújo dos Santos, J Bressan (2013) Intestinal microbiota; relevance to obesity and modulation by prebiotics and probiotics. *Nutr Hosp.* 28 (4): 1039–1048.

- [258] C Hill, F Guarner, G Reid, GR Gibson, DJ Merenstein, ME Sanders (2014) Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11 (8): 506–514.
- [259] M Green, K Arora, S Prakash (2020) Microbial Medicine : Prebiotic and Probiotic Functional Foods to Target Obesity and Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci* 21 (8):2890.
- [260] P Van den Abbeele, C Grootaert, M Marzorati, S Possemiers, W Verstraete, T Van de Wiele (2010) Microbial Community Development in a Dynamic Gut Model Is Reproducible, Colon Region Specific, and Selective for Bacteroidetes and Clostridium Cluster IX. *Appl Environ Microbiol* 76 (15): 5237–5246.
- [261] T Van de Wiele, P Van den Abbeele, W Ossieur, S Possemiers, M Marzorati (2015) The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). in: Impact Food Bioact. Heal., Springer International Publishing, Champp. 305–317.
- [262] M Marzorati, V Maquet, S Possemiers (2017) Fate of chitin-glucan in the human gastrointestinal tract as studied in a dynamic gut simulator (SHIME®). *J Funct Foods* 30: 313–320.
- [263] L Liu, Q Wang, X Wu, H Qi, R Das, Y Luo (2020) Vancomycin exposure caused opportunistic pathogens bloom in intestinal microbiome by simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). *Environ Pollut* 265: 114399.
- [264] EC Davis, AM Dinsmoor, M Wang, SM Donovan (2020) Microbiome Composition in Pediatric Populations from Birth to Adolescence: Impact of Diet and Prebiotic and Probiotic Interventions. *Dig DisSci* 65 (3): 706–722.
- [265] C Carlucci, EO Petrof, E Allen-Vercoe (2016) Fecal Microbiota-based Therapeutics for Recurrent *Clostridium difficile* Infection, Ulcerative Colitis and Obesity. *EBioMedicine* 13: 37–45.
- [266] EO Méndez-Salazar, MG Ortiz-López, MDLÁ Granados-Silvestre, B Palacios-

- González, M Menjivar (2018) Altered gut microbiota and compositional changes in firmicutes and proteobacteria in mexican undernourished and obese children. *Front Microbiol* 9 (2494): 1–11.
- [267] K Berding, HD Holscher, AE Arthur, SM Donovan (2018) Fecal microbiome composition and stability in 4- to 8-year old children is associated with dietary patterns and nutrient intake. *J Nutr Biochem* 56: 165–174.
- [268] A Zhernakova, A Kurilshikov, MJ Bonder, EF Tigchelaar, M Schirmer, J Fu (2016) Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* 352 (6285): 565–569.
- [269] E Rinninella, P Raoul, M Cintoni, F Franceschi, G Miggiano, M Mele (2019) What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7 (1): 14.
- [270] VK Ridaura, JJ Faith, FE Rey, J Cheng, AE Duncan, JI Gordon (2013) Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science* 341 (6150): 1241214–1241214.
- [271] F Backhed, H Ding, T Wang, L V. Hooper, GY Koh, JI Gordon (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (44): 15718–15723.
- [272] MA Sze, PD Schloss (2016) Looking for a Signal in the Noise: Revisiting Obesity and the Microbiome. *MBio* 7(4):e01018-e16.
- [273] J Lloyd-Price, G Abu-Ali, C Huttenhower (2016) The healthy human microbiome. *Genome Med* 8 (1): 51.
- [274] EF Murphy, PD Cotter, A Hogan, O O'Sullivan, A Joyce, F Shanahan (2013) Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. *Gut* 62 (2): 220–226.
- [275] FJ Verdam, S Fuentes, C de Jonge, EG Zoetendal, R Erbil, SS Rensen (2013)

- Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity (Silver Spring)* 21 (12): E607–E615.
- [276] L Zhao (2013) The gut microbiota and obesity: From correlation to causality. *Nat Rev Microbiol* 11 (9): 639–647.
- [277] A Ahmad, W Yang, G Chen, M Shafiq, S Javed, H Bokhari (2019) Analysis of gut microbiota of obese individuals with type 2 diabetes and healthy individuals. *PLoS One* 14 (12) : 252-264.
- [278] S Hiel, MA Gianfrancesco, J Rodriguez, D Portheault, Q Leyrolle, NM Delzenne (2020) Link between gut microbiota and health outcomes in inulin -treated obese patients: Lessons from the Food4Gut multicenter randomized placebo-controlled trial. *Clin Nutr* 39(12): 3618-3628.
- [279] K Chen, H Zhao, L Shu, H Xing, C Wang, G Song (2020) Effect of resveratrol on intestinal tight junction proteins and the gut microbiome in high-fat diet-fed insulin resistant mice. *Int J Food Sci Nutr* 71(8):965-978.
- [280] O Maya-Lucas, S Murugesan, K Nirmalkar, LD Alcaraz, C Hoyo-Vadillo, J García-Mena (2019) The gut microbiome of Mexican children affected by obesity. *Anaerobe* 55: 11–23.
- [281] CL Williams, N Garcia-Reyero, CJ Martyniuk, CW Tubbs, JH Bisesi (2020) Regulation of endocrine systems by the microbiome: Perspectives from comparative animal models. *Gen Comp Endocrinol* 292 (13437).
- [282] G den Besten, K van Eunen, AK Groen, K Venema, D-J Reijngoud, BM Bakker (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* 54 (9): 2325–2340.
- [283] G Velmurugan, T Ramprasath, M Gilles, K Swaminathan, S Ramasamy (2017) Gut Microbiota, Endocrine-Disrupting Chemicals, and the Diabetes Epidemic. *Trends Endocrinol Metab* 28 (8): 612–625.

-
- [284] GT Macfarlane, S Macfarlane (2012) Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *J AOAC Int* 95 (1): 50–60.
- [285] S Murugesan, K Nirmalkar, C Hoyo-vadillo, M García-espitia, D Ramírez-sánchez, J García-mena (2017) Gut microbiome production of short-chain fatty acids and obesity in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37(4):621-625.
- [286] KP Scott, SW Gratz, PO Sheridan, HJ Flint, SH Duncan (2013) The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res* 69 (1): 52–60.
- [287] A-M Davila, F Blachier, M Gotteland, M Andriamihaja, P-H Benetti, D Tomé (2013) Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacol Res* 68 (1): 95–107.
- [288] EP Nyangale, DS Mottram, GR Gibson (2012) Gut Microbial Activity, Implications for Health and Disease: The Potential Role of Metabolite Analysis. *J Proteome Res* 11 (12): 5573–5585.
- [289] HS Ejtahed, P Angoorani, AR Soroush, R Atlasi, S Hasani-Ranjbar, ... B Larijani (2019) Probiotics supplementation for the obesity management; A systematic review of animal studies and clinical trials. *J Funct Foods* 52 (2018): 228–242.

ANEXO

Información suplementaria

S1. Modelo de carta de información y consentimiento informado entregados a las madres (Cap. 1).



Tel.: +54 (0)342 453 0302
Santiago del Estero 2829
S3000AOM Santa Fe

Instituto de Lactología Industrial
Universidad Nacional del Litoral

INLAIN

azalazar@fiqus.unl.edu.ar
jorreinh@fiqus.unl.edu.ar

Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas

HOJA DE INFORMACIÓN A LA MAMÁ DONANTE DE LECHE MATERNA

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación "ESTUDIO DE LA MICROBIOTA DE LECHE MATERNA EN MADRES PREMATURAS Y A TÉRMINO DE LA CIUDAD DE SANTA FE" que está siendo realizado por el Dr. Gabriel Vinderola en el Instituto de Lactología Industrial (CONICET-UNL) en Santa Fe, Argentina.

Antecedentes:

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

Estudiar la microbiota de la leche materna en mamás que dieron a luz a su bebé por cesárea, a término (más de 37 semanas de gestación) o de forma prematura (menos de 34 semanas de gestación), y conocer sus diferencias.

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Se le pide su participación en este estudio por su predisposición a alimentar a su hijo con lactancia natural y por la importancia de conocer la diversidad microbiana de la leche materna en mamás a término y prematuras, y porque no se han realizado estudios de este tipo en la región.

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos una muestra, no invasiva, de leche materna, obtenida durante la primer semana postparto a término (por cesárea) o durante la primer semana luego del parto prematuro y una semana después de la llegada a la edad gestacional "a término" del bebé de mamás prematuras, con el fin de estudiar de forma comparativa la diversidad microbiana. Si Ud. decide participar, le proveeremos un colector estéril y le solicitaremos que colecte Ud. misma una pequeña cantidad (5-10 mL) de leche materna, la cual pasaremos a recoger cuando nos indique, preferentemente dentro de la hora de ser obtenida. La muestra puede congelarse una vez recolectada. También necesitaremos pedirle alguna información básica sobre su alimentación el día antes del parto. Esta información se recogerá mediante un cuestionario sencillo.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

Los resultados de los análisis no afectarán a su salud ni la de su bebé, ya que no es un procedimiento invasivo. El riesgo previsible de su participación únicamente será el mínimo desconfort que podría conllevar la extracción de una muestra de leche materna.

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

Contribuir al mejor conocimiento científico de uno de los factores que hacen que la lactancia materna sea el alimento esencial para los lactantes, como es la microbiota de la leche materna.

¿Cuáles son los costes y existe remuneración?

Su participación en este estudio no representará ningún costo para ustedes. Usted no recibirá ninguna remuneración por participar en el estudio en particular. Su participación es desinteresada y con fines de colaborar con la generación de conocimientos científicos, los cuales pueden en el futuro colaborar con el desarrollo de la sociedad.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. Gabriel Vinderola en el teléfono 0342 4530302 interno 5 o 3426311943 (whatsapp).

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?

La muestra de leche materna será utilizada exclusivamente con fines científicos. Se analizará mediante técnicas de secuenciación masiva, la identidad de todas las bacterias presentes en la muestra, así también como la composición de ácidos grasos de cadena corta.

Confidencialidad:

Todos sus datos, serán tratados con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Toda la información generada durante este estudio, incluyendo los cuestionarios y la información sobre la microbiota presente en las muestras analizadas, será codificada. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación. La información se almacenará en una base de datos perteneciente al equipo investigador, no siendo compartida con ninguna persona o entidad ajenas a este proyecto. Ud. puede solicitar en cualquier momento la retirada del estudio, así como la destrucción de sus muestras biológicas. Para ello deberá contactar al investigador responsable del proyecto.

Normativa y legislación

El proyecto cumple con las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los Criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la Declaración de Helsinki (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo), (Octubre 2008 Seúl, Corea) y (Octubre 2013 Fortaleza, Brasil).

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: **"ESTUDIO DE LA MICROBIOTA DE LECHE MATERNA EN MADRES PREMATURAS Y A TÉRMINO DE LA CIUDAD DE SANTA FE"** que está siendo realizado por el Dr. Gabriel Vinderola en el Instituto de Lactología Industrial (CONICET-UNL) en Santa Fe, Argentina.

Madre/Padre (responsable legal 1): _____
 hemos sido informado por el Dr. Gabriel Vinderola, responsable del proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que:

- He leído la hoja de Información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio
- Comprendo que mi participación es voluntaria
- Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente

Autorizo a que la muestra obtenida sea utilizada durante el proyecto de investigación arriba mencionado Sí No

Comprendo que mis datos serán tratados confidencialmente y desvinculados de mi identidad Sí No

Quiero ser informada en caso de obtenerse alguna información y/o resultado que pueda ser relevante para mi salud o la de mi familia: Sí No

Con esto damos nuestra conformidad para participar en este estudio,

Firma del responsable legal 1:	Firma del investigador
Fecha:	Fecha:

S2. Encuesta realizada a las madres (Cap. 1).

Nombre de Mamá: _____

Nº de muestra: _____

Datos del bebé:

Sexo: Femenino/Masculino

Mellizos o Gemelos?: Sí / No

Sufrió alguna enfermedad y/o afección grave en el primer año de vida? Sí/No

En caso de que "Sí", cuál? _____

Datos de la mamá:

Edad: _____

Peso y altura antes del embarazo: _____

Ganancia de peso durante el embarazo: _____

Madre primeriza? _____

En caso de que "No", cuántos hijos previos al embarazo tuvo? _____

Durante el embarazo:

Diabetes gestacional? No

Tratamiento con Antibióticos? Sí / No

En caso de que "Sí", cuál? _____

Tratamiento con Corticoides? Sí / No

En caso de que "Sí", cuál? _____

Fumo tabaco previamente al embarazo y/o lactancia? Sí / No

Fumo tabaco durante el embarazo y/o lactancia? Sí / No

Durante la lactancia:

Tuvo una lactancia exclusiva y/o suplementada con leche de formula? Sí / No

Sufrió de mastitis? Sí / No Obs. _____

Sufrió alguna otra complicación y/o dificultad? Sí / No

En caso de que "Sí", cuál? _____

S3. Nota a madres Cap. 2).



Tel.: +54 (0)342 453 0302
Santiago del Estero 2829
S3000AOM Santa Fe

jorreinh@fiq.unl.edu.ar
aquibe@fiq.unl.edu.ar

Instituto de Lactología Industrial
Universidad Nacional del Litoral
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas

Santa Fe, Abril de 2016

Estimada Mamá:

Somos un grupo de investigadores y becarios del Instituto de Lactología Industrial de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral y del CONICET que trabajamos estudiando la microbiología de la leche materna. Desde el 2008 nos dedicamos a estudiar la presencia en este vital alimento de microorganismos benéficos para la salud intestinal del bebé y la maduración de su sistema inmunológico.

Es importante que Ud. sepa que a través de la leche materna, Ud. le ofrece a su bebé todos los nutrientes y defensas necesarios para que crezca sano y fuerte. Además, y desde el año 2003 gracias a estudios llevados a cabo en España, se conoce que la leche materna es también fuente de microorganismos benéficos para su bebé, llamados bifidobacterias y lactobacilos.

En nuestro laboratorio, y entre los años 2008 y 2015 estudiamos la presencia en leche materna de bifidobacterias y queremos ahora comenzar estudios para conocer también la presencia de lactobacilos.

En este contexto invitamos a Ud. a donarnos unas pocas gotitas de leche materna para realizar estos estudios, y de esta forma contribuir al avance de la ciencia y del conocimiento de la composición e importancia de la leche materna para el bebé. Esta muestra será utilizada exclusivamente con fines de investigación y de forma anónima. Cualquier duda, estamos a su disposición para responder cualquier inquietud en la que podamos serle útiles.

Muchas gracias!

Dr. Gabriel Vinderola
Investigador de CONICET
Instituto de Lactología Industrial
Profesor Cátedra de Microbiología
Facultad de Ingeniería Química
Universidad Nacional del Litoral
Santiago del Estero 2829, Santa Fe
gvinde@fiq.unl.edu.ar
0342 156 311 943

S4. Ingredientes y contenido nutricional de los productos comerciales utilizados
(Cap. 2, Sec. 3.9).

Bebida de avena

Avena orgánica (12 % p/v) y sal.

Contenido nutricional cada 100 g:

Energía	44 kcal
Grasa	0,6 g
de los cuales son saturados	0,1 g
Carbohidratos	8,5 g
de los cuales son azúcares	2,7 g
Fibra dietética	0,5 g
Proteína	0,8 g
Sal	0,1 g



Jugo de frutilla-zanahoria-manzana

Jugo y pure concentrados de manzana y zanahoria (30 % p/v), de frutilla (7 % p/v), puré de acerola, jugo de limón, jugo de naranja, espesante (peptina), regulador de acidez ácido cítrico. Sin azúcares añadidos. Contiene azúcares de forma natural de bayas y frutas (12 g / 100 g). Se usaron jugos y pulpas orgánicos de frutilla, zanahoria y manzana. El producto no contiene leche.

Contenido nutricional cada 100 g:

Energía	48 kcal
Grasa	0 g
de las cuales son saturadas	0 g
Carbohidratos	12 g
de los cuales son azúcares	12 g
Proteína	0 g
Sal	0,07 g



Jugo de manzana:

100 % jugo de manzana orgánico. No contiene productos lácteos.

Contenido nutricional cada 100 g:

Energía	40 kcal
Grasa	0 g
de los cuales saturados	0 g
Carbohidratos	10 g
de los cuales son azúcares	10 g
Fibra dietética	0 g
Proteína	0 g
Sal	0,00 g



S5.

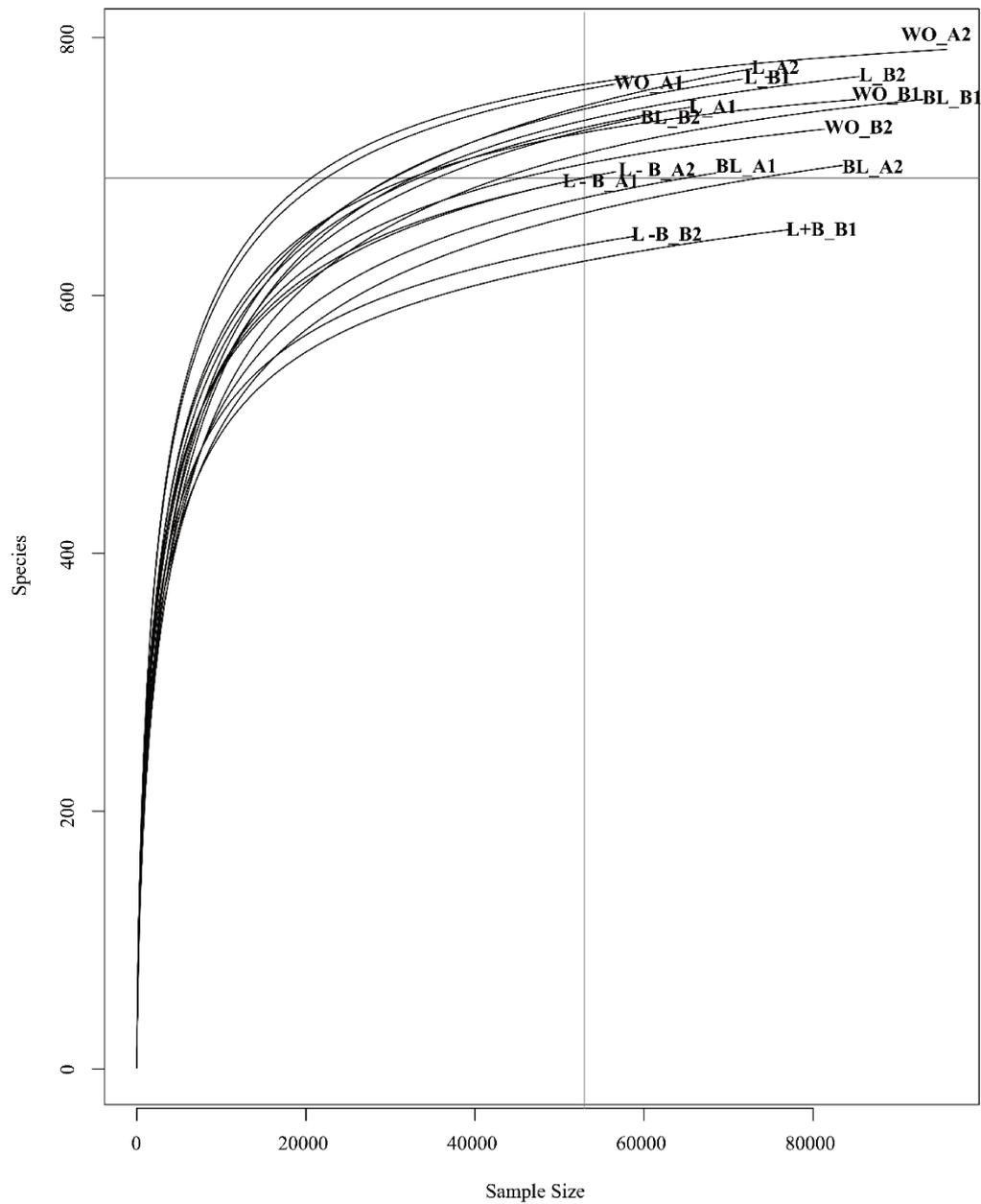


Figura 1. Curva de rarefacción de la secuenciación 16S ARNr de las muestras. La longitud de las curvas refleja la cobertura de la variable secuenciación por muestra. BL: estabilización, L: el tratamiento con *L. plantarum* 73a, WO: wash-out y L - B: el tratamiento con *L. plantarum* 73a y *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. Reactor: A y B. Muestras: 1 y 2.