

## Resumen- Castellano

**Antecedentes:** La leche materna es el alimento natural ideal para el desarrollo y la protección del recién nacido y el niño en crecimiento. Estudios recientes han demostrado la presencia de bacterias en la leche materna en condiciones de salud, y se cree que podrían conferir propiedades beneficiosas para el bebé. Sin embargo, poco se sabe sobre la relación entre las bacterias y los macronutrientes de la leche y las células humanas, y no existe un protocolo óptimo para estimar el número de bacterias en las muestras. Además, hasta la fecha no se ha explorado la posible presencia de hongos en la leche materna, a pesar de que previamente éstos se han encontrado en la leche de otros animales y en el intestino neonatal. Por otro lado, la etiología de la mastitis sub-aguda no está bien descrita. Esta tesis está dirigida a mejorar nuestra comprensión de la microbiota de la leche materna, su composición y diversidad, así como las interacciones con otros componentes de la leche y microorganismos en condiciones de salud y durante la mastitis sub-aguda. También exploramos el efecto potencial de factores ambientales, como el tipo de parto y el origen geográfico, y el periodo de la lactancia en la composición de la microbiota de la leche materna.

**Métodos:** Se utilizaron tecnologías de secuenciación de próxima generación dirigidas al gen bacteriano 16S rRNA y a los genes fúngicos 28S rRNA y la región ITS1, en combinación con análisis microbiológicos clásicos, para evaluar la composición bacteriana y fúngica en la leche de madres sanas, y de madres con mastitis sub-aguda. Las cargas bacterianas y fúngicas en la leche materna se obtuvieron mediante la metodología qPCR calibrada con citometría de flujo.

**Resultados:** La composición bacteriana en la leche materna tiene una alta variabilidad interindividual, y también a lo largo del tiempo, y está compuesta predominantemente por bacterias de la familia Staphylococaceae. Se encontró un "núcleo" de bacterias y hongos en la leche materna de donantes españolas. Se observaron algunas correlaciones entre bacterias con los macronutrientes de la leche y células somáticas humanas, lo que indica una relación activa entre la microbiota de la leche y el medio ambiente. La densidad bacteriana resultó ser más alta que lo estimado previamente según los métodos de cultivo, a una media de  $10^6$  células/ml, presentes tanto en estado libre como asociadas a células humanas. No se observaron correlaciones entre carga bacteriana, el número de células somáticas, y la riqueza y diversidad bacteriana, lo que podría indicar que un aumento en la densidad bacteriana en condiciones de salud no activa una respuesta inmune en la glándula mamaria, ni altera la comunidad microbiana. Además, nuestros resultados de secuenciación revelaron la existencia de hongos en la leche materna que se confirmó mediante métodos de cultivo y microscopía. El 89% de las muestras españolas analizadas tenían niveles detectables de ADN fúngico, con una carga aproximada de  $10^5$  células/ml. *Malassezia*, *Candida* y *Saccharomyces* eran prevalentes en las muestras, y se observaron diferentes interacciones fúngicas con los componentes de la leche. La presencia de hongos en la leche se confirmó posteriormente en muestras de

orígenes geográficos distantes, y se observó que factores maternos y tipo de parto pueden afectar a las comunidades microbianas de la leche. Después de describir la microbiota de la leche en condiciones de salud, realizamos un estudio observacional prospectivo de casos/controles, donde se estudió el ADN y el ARN de la microbiota de la leche de madres sanas y madres con mastitis sub-aguda, antes y después del tratamiento. La carga bacteriana aumentó durante la enfermedad, la diversidad disminuyó y las alteraciones en la composición bacteriana probablemente reflejen un proceso disbiótico en la glándula mamaria. Esto apoya que la mastitis sub-aguda es una enfermedad de origen microbiano. Investigaciones futuras deberían ir más allá de la caracterización de la composición de la microbiota de la leche e investigar mecanismos funcionales entre los microorganismos y la salud infantil, incluido el desarrollo inmunitario y la microbiota. Además, se necesitan más estudios para comprender cómo mantener un estado saludable en la glándula mamaria. Con este fin, las biomoléculas y células de la leche materna deberían investigarse por su posible uso como biomarcadores de la disbiosis mamaria, como el que ocurre durante la mastitis sub-aguda.