

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE**

**Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales**

**Sustentabilidad y tecnología**

**PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)**

**Programa de desarrollo tecnológico para la sustentabilidad ambiental  
energética y alimentaria.**



**ITESO, Universidad  
Jesuita de Guadalajara**

**4D12 Microbiota en niños**

**Análisis de la microbiota intestinal en niños y niñas en situación vulnerable**

**PRESENTAN**

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en biotecnología. Julieta Eusebio Barreto

Lic. en nutrición. Diana Laura Moreno Jiménez

Ing. en biotecnología. Adrián Ruiz Chávez

Ing. en biotecnología. Adrián Alberto Saldaña Mireles

Ing. en biotecnología. Elvira Daniela Vázquez Cervantes

Profesoras PAP: Sarah Ratkovich González, Mariana del Rocío Ruiz Briseño,

Anayeli de Jesús Patiño Laguna

Tlaquepaque, Jalisco, febrero de 2024

## ÍNDICE

### Contenido

REPORTE PAP .....	3
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional .....	3
Resumen .....	0
1.    Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	0
1.1    Entendimiento del ámbito y del contexto .....	1
Consideraciones bioéticas del desarrollo del proyecto.....	1
Consideraciones de Buenas Prácticas de Laboratorio del manejo y transporte de las muestras .....	2
1.2 Caracterización de la organización.....	5
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	6
1.4. Planeación de alternativa(s).....	8
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora .....	11
1.5.1 Manuales de procedimientos .....	11
1.5.2 Estandarización de la extracción de ADN.....	11
1.5.3 Estandarización de primers por PCR punto final .....	12
1.5.4 Visita ONI (Organismo de Nutrición Infantil) .....	15
1.5.5 Artículo de revisión .....	16
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos .....	17
1.7. Bibliografía y otros recursos .....	19
1.8. Anexos generales.....	23
1.8.1 Portada de algunos manuales realizados .....	23
1.8.2 Primer BLAST.....	25
1.8.3 Presentación en ONI del proyecto .....	32
1.8.4 Presentación en línea de toma de muestra e infografía .....	32
1.8.5 Consentimiento informado y cuestionario de historial.....	34
1.8.6 Trabajo en laboratorio .....	36
1.8.7 Muestra de carteles de presentación final PAP .....	37

1.8.8 Avances de artículo de revisión.....	37
2. Productos .....	38
2.1 Manuales de procedimientos .....	38
2.2 Estandarización de la extracción de ADN.....	39
2.3 Estandarización de primers por PCR punto final .....	40
2.4 Ficha descriptiva de visita a ONI (Organismo de Nutrición Infantil) .....	49
2.5 Ficha descriptiva de artículo de revisión sobre microbiota intestinal y su impacto en la salud infantil .....	50
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	53
3.1 Sensibilización ante las realidades .....	54
3.2 Aprendizajes logrados .....	58

## REPORTE PAP

### Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

*Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.*

*El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).*

*El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.*

*El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.*

*El Reporte PAP consta de tres componentes:*

*El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.*

*El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.*

*El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.*

## Resumen

Durante el periodo de primavera 2024, se llevó a cabo el proyecto "Análisis de la microbiota intestinal en niños en situación vulnerable", con el propósito de abordar las dificultades que enfrentan los niños y niñas en su bienestar físico o social, mediante un enfoque innovador centrado en la salud, la alimentación y la calidad de vida, con el objetivo de mejorar su microbiota intestinal. Los objetivos específicos durante este período incluyeron el diseño de manuales para estrategias de intervención nutricional, la toma de medidas antropométricas, el manejo y resguardo de material biológico infeccioso, así como la estandarización de metodologías moleculares para el análisis de la microbiota en el laboratorio. Además, se preparó material didáctico sobre el proyecto para presentarlo al Organismo de Nutrición Infantil y a los padres de familia o tutores de los participantes del estudio. Se llevó a cabo una exhaustiva investigación para la creación de los manuales y se realizaron procesos de estandarización de extracción de ADN de heces fecales y de primers. Se estableció un vínculo con el Organismo de Nutrición Infantil para futuras colaboraciones y se planificaron visitas adicionales. Entre los productos desarrollados se encuentran los manuales de procedimientos mencionados anteriormente, la estandarización de primers de algunos microorganismos como Firmicutes y *Roseburia sp*, así como recomendaciones para continuar con la estandarización de otros microorganismos y de la extracción de ADN. Además, se avanzó en el artículo de revisión sobre la microbiota, se diseñó una infografía para los tutores y padres de familia sobre la toma de muestras y se reclutaron datos de 30 participantes en el estudio para el verano.

### 1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

## 1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

### Consideraciones bioéticas del desarrollo del proyecto

Por la naturaleza de la presente investigación es indispensable tomar en cuenta las consideraciones bioéticas establecidas en la declaración de Helsinki, la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud (LGSMIS) y la Ley General de Salud (LGS) que pudieran tener implicaciones relevantes dentro del trabajo. Esto, ya que se realizarán pruebas en heces humanas lo que implica pruebas en humanos. Por lo indicado anteriormente, se expresan las enmiendas, aclaraciones, principios y leyes contenidas dentro de los artículos del Diario Oficial de la Federación y las leyes antes mencionadas que competen en este proyecto para lograr los fines establecidos.

Se contempló en base a la última reforma DOF 03-01-2024 aplicada a la Ley General de Salud (LGS) publicada en el diario oficial de la federación en febrero de 2024, la LGSMIS y la declaración de Helsinki las siguientes consideraciones: consentimientos informados en materia de investigación en humanos, evaluaciones bioéticas, confidencialidad y privacidad del sujeto/s de estudio y todos los datos recabados en relación a éste, beneficios y riesgos del sujeto/s de estudio y los participantes en la investigación, monitoreo continuo del sujeto/s de estudio previo, durante y posterior a la investigación, reglamentación para regular el manejo y disposición final de las muestras biológicas utilizadas durante la experimentación en laboratorio y su posterior análisis, manejo de datos estadísticos de la población sujeta al estudio y la posible publicación de los resultados obtenidos, así como la divulgación de estos resultados de manera pública.

De la declaración de Helsinki se contemplaron los principios 4-36 los cuales competen en esta investigación con relación a fines bioéticos, asegurando la protección de los derechos, la seguridad y el bienestar de los participantes, incluyendo la necesidad de obtener el consentimiento informado de los participantes o de sus representantes legales, así como la garantía de la confidencialidad y la privacidad de los datos recopilados (World Medical Association, 2013). En cuanto a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud se contemplaron los artículos 3-130, los cuales establecen un marco normativo

detallado que regula la realización de investigaciones en el ámbito de la salud, asegurando la protección de los derechos y el bienestar de los participantes. En estos artículos se abordan aspectos claves como la consideración de posibles beneficios y riesgos para los participantes, la aprobación por parte de un comité de ética en investigación y la confidencialidad y privacidad de la información (Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, 2014).

Finalmente, en cuestión de la Ley General de Salud, se contemplan los artículos 96-103 junto con sus fracciones del título quinto llamado Investigación para la salud, los cuales establecen lineamientos éticos y legales que deben seguirse al llevar a cabo investigación en el ámbito de la salud. También se consideraron los artículos 110 y 111 del título séptimo de promoción de la salud, así como los artículos 112 y 113 del Capítulo II sobre Educación para la salud, ya que abordan la importancia de promover estilos de vida saludables y educar a la población sobre aspectos relacionados con la salud, lo cual influye en el contexto del presente estudio. Además, se tuvieron presentes los artículos 158-161 del Capítulo III sobre Enfermedades no Transmisibles que caben dentro del estudio ya que la composición de la microbiota intestinal puede influir en el riesgo de desarrollar alguna enfermedad, por lo que abordar las consideraciones éticas, legales y de promoción de la salud es esencial durante la investigación (Ley General de Salud, 2024).

### Consideraciones de Buenas Prácticas de Laboratorio del manejo y transporte de las muestras

La investigación científica rigurosa requiere de un sistema de buenas prácticas de laboratorio para establecer los estándares protocolarios que aseguran la integridad y reproducibilidad de los datos a analizar. De acuerdo con la implementación de procedimientos que nos permitan asegurar la mayor calidad de las muestras obtenidas para lograr la estandarización de los manuales en la primera etapa de este proyecto nos apegaremos a los principios de las normas oficiales mexicanas de la secretaria de salud y el sistema de gestión de la calidad en el laboratorio (LQMS) perteneciente a la OMS.

Las disposiciones regulatorias que identificamos para el manejo y transporte adecuado de las muestras que cumplan con la NOM, se resumen de la siguiente manera:

- NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - salud ambiental – residuo-peligrosos biológico-infecciosos - clasificación y especificaciones de manejo
- NOM-012-SSA3-2012, Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de Investigación para la salud en seres humanos.
- NOM-037-SSA3-2016, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios de anatomía patológica.
- NOM-004-SSA3-2012, establece los criterios científicos, éticos, tecnológicos y administrativos obligatorios en la elaboración, integración, uso, manejo, archivo, conservación, propiedad, titularidad y confidencialidad del expediente clínico.
- NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.

La fase del sistema de gestión de la calidad para recoger, registrar y transportar las muestras se identificará como la fase preanalítica. Posterior a esta, se trabajará en las fases analítica y post-analítica. Para que el itinerario del flujo de trabajo se lleve a cabo de forma correcta en la primera fase y los resultados sean fiables, se considerará un sistema que comprende 12 elementos clave que pueden adaptarse a las necesidades de nuestro proyecto, los cuales son:

1. Organización
2. Personal
3. Documentos y registros
4. Gestión de procesos
5. Seguridad e instalaciones
6. Equipos
7. Gestión de la información
8. Gestión de incidencias
9. Servicio al estudiado
10. Compras e inventario
11. Evaluación
12. Mejora continua de procesos

La supervisión de las muestras es uno de los temas principales de la gestión de procesos. La calidad de los resultados obtenidos sea positivos o negativos en cuanto al rumbo de la investigación poseerán la calidad de las muestras recibidas. Para asegurar que estas cumplen con todos los requisitos para replicar resultados analíticos concretos se establecerán instrucciones por escrito que aparecerán en al menos tres manuales de forma detallada divididos en; 1) documentación, codificación y resguardo de muestras, 2) manejo de muestras biológicas infecciosas, y 3) manejo y disposición de RPBI, y que abordarán las principales políticas de:

- Recogida de la muestra: Utilizar recipientes estériles y asegúrate de que estén correctamente etiquetados con información relevante, como la identificación del paciente, la fecha y la hora de la recolección.
- Transporte adecuado: Si la muestra no se procesará inmediatamente, asegurarse de mantenerla refrigerada o congelada según las instrucciones específicas del laboratorio o del protocolo de investigación.
- Procesamiento oportuno: Las muestras deben ser procesadas tan pronto como sea posible para minimizar la degradación de los componentes biológicos y evitar la contaminación.
- Almacenamiento adecuado: Si es necesario almacenar las muestras antes de su procesamiento, hacerlo según las condiciones recomendadas para preservar la integridad de los componentes biológicos.
- Procedimientos de seguridad: Utilizar equipo de protección personal (EPP) adecuado al manipular muestras biológicas para protegerte a ti mismo y a otros de posibles riesgos biológicos.
- Eliminación segura de desechos: Desechar los materiales utilizados para la recolección y manipulación de las muestras de manera segura y de acuerdo con los protocolos de eliminación de desechos biológicos.
- Documentación precisa: Registrar de manera precisa y completa toda la información relacionada con la muestra, incluyendo la identificación del paciente, el método de recolección, y cualquier observación relevante.

- Cumplimiento normativo: Asegurar cumplir con todas las regulaciones y normativas aplicables relacionadas con la recolección, manipulación y almacenamiento de muestras biológicas, incluyendo aquellas relacionadas con la privacidad del paciente y la ética de la investigación.

## 1.2 Caracterización de la organización

ONI (Organismo de Nutrición Infantil) es una asociación civil que se encuentra en Jalisco con más de 60 años de intensa labor y servicio, encargándose de la prevención y recuperación de la malnutrición de más de 200,000 de niñas y niños (NN) de escasos recursos. Esta asociación se encuentra extendida a Nayarit y Michoacán.

La institución busca evitar la malnutrición desde el embarazo y ayudar a NN pequeños que la sufren y viven en condiciones de pobreza alimentaria. Esto se logra mediante la educación de las familias, la provisión de suplementos alimenticios y el seguimiento nutricional, con el objetivo de promover el desarrollo integral de los niños con una buena alimentación (Organismo de Nutrición Infantil, 2023).

ONI tiene programas con cobertura en la Zona Metropolitana de Guadalajara (ZMG), en zonas indígenas (Sierra Wixárika), Poncitlán y Michoacán. En 2022 diagnosticaron a sus 4,752 beneficiarios (desde 6 meses de edad hasta más de 3 años), donde por medio del peso y la talla un 75% se evaluó como en estado de normopeso, 13% con sobrepeso, 7% desnutrición leve, 3% obesidad, 1% desnutrición moderada y 1% desnutrición grave. Así mismo entregaron 108.9 toneladas de alimento en 164,677 dotaciones (Organismo de Nutrición Infantil, 2023).

La asociación cuenta con un modelo de interacción donde las familias son capacitadas en temas referentes a nutrición, salud, desarrollo humano y tecnologías domésticas por medio de un libro de trabajo con temas para la integración familiar, así como un programa de nutrición que proporciona a NN dotaciones semanales de complemento alimenticio de acuerdo con su edad y estado nutricional. Esta además dispone de centros conformados por profesionistas de nutrición y trabajo social que llevan los programas de interacción, además

de una planta de producción donde se elabora la Onifórmula (Organismo de Nutrición Infantil, 2023).

Además de la familia ONI en planta y oficinas conformada por coordinadores de programas, operaciones, jefes de calidad, nutriólogos, intendencia, trabajadoras sociales, producción, recursos humanos, diseñadores, ventas, contadores, etc., el organismo dispone de vinculaciones con empresas como: Innova, Vitasanitas, Sesajal, Envato, Cevecería Loba, Grupo Vida, entre otras; el gobierno de Guadalajara junto con organismos como el DIF Zapopan y el Sistema de Asistencia Social; la academia dentro de la cual se incluyen universidades como: ITESO, Tecnológico de Monterrey, UTEG, Universidad Panamericana, UNIVA, UNE, la Universidad de Guadalajara, entre otras; y finalmente, se ha vinculado con instituciones sociales como: Fundación LALA, Cemefi, Teletón, Fundación González Iñigo, entre otras (Organismo de Nutrición Infantil, 2023).

### 1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

En México, según datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de 2022, la prevalencia de obesidad y bajo peso en la población infantil siguen siendo motivo de preocupación para la salud pública. La desigualdad social que existe en el país afecta de manera directa la salud de los NN. El acceso limitado a alimentos nutritivos debido a restricciones económicas conduce a dietas desequilibradas favoreciendo el consumo excesivo de alimentos ultraprocesados, los cuales pueden alterar la composición y diversidad de la microbiota.

Por lo tanto, en este proyecto que planteó identificar y conocer las posibles alteraciones en la microbiota intestinal de NN que acuden al Organismo de Nutrición Infantil (ONI) y se encuentran en situación vulnerable, con el fin de evaluar su estado nutricional y detectar problemas como desnutrición, malnutrición y obesidad, así como brindar retroalimentación sobre su estado nutricional.

Se identificó la falta de educación nutricional adecuada entre NN que acuden a ONI. Esta carencia contribuye a la perpetuación de hábitos alimenticios poco saludables y, en muchos casos, conduce a problemas nutricios. Es fundamental abordar esta problemática para garantizar el bienestar y el desarrollo integral de los infantes, así como para prevenir enfermedades relacionadas con la mala alimentación a largo plazo.

En la tabla 1 se pueden observar los posibles riesgos o complicaciones que se pueden presentar durante la elaboración del proyecto, incluyendo su impacto y probabilidad, así como las acciones a tomar para prevenir y para resolver en caso de suceder.

Tabla 1. Riesgos y acciones a tomar.

Riesgo	Riesgo fuente	Impacto (1-5)	Probabilidad (1-5)	Acción preventiva a tomar	Acción a tomar después del suceso
Datos incompletos para la realización del proyecto	Sesgo en datos obtenidos en las encuestas a las familias de los niños.	3	4	Realizar una encuesta minuciosa para que el usuario pueda contestar de la manera más honesta posible.	Trabajar con los datos proporcionados sabiendo que puede existir un posible sesgo, incluyendo una discusión sobre ello.
Datos incompletos para la realización del proyecto	No tener el consentimiento de NN o sus familiares para poder llevar a cabo la investigación.	4	3	Tener cuidado en cómo se pide el consentimiento informado y poder dejar en claro que será para una buena causa y sin ningún daño a ninguna persona.	Continuar con el proyecto con el número de sujetos que aceptaron entrar al estudio y poder discutir sobre un posible sesgo en la edad de los niños o en la región en la que viven.
Datos incompletos para la realización del proyecto	La deserción de los sujetos a mitad del estudio.	3	2	Mediante el consentimiento informado tener claro el propósito del estudio y que no hay riesgos a la salud o de	Descartar los datos y muestras de los sujetos que desertaron y no tomarlos en cuenta para los resultados finales.

				alguna otra índole.	
Financiero	No recibir el apoyo económico que se solicitó al gobierno para llevar a cabo el estudio.	4	2	Realizar el escrito adecuado para la solicitud de dinero hacia el gobierno sustentando todo lo que se haría y con la formalidad que se merece.	Se trabaja con el equipo y reactivos que se tienen y se pudiera pedir apoyo por otros medios.
Falta de tiempo	No terminar el estudio o no tener los resultados en un tiempo determinado.	2	3	Realizar un cronograma y poder seguirlo en tiempo y forma para presentar resultados a tiempo.	Presentar los resultados más relevantes que se tienen hasta el momento y poder tener un plano de perspectivas más amplio.
Permiso denegado	No tener el permiso mediante un comité para llevar a cabo el estudio	4	2	Tener el conocimiento necesario sobre la Ley General de Salud en el área de investigación y la declaración de Helsinki para poder tener un buen sustento sobre el proyecto.	Realizar otra solicitud a otro comité de una manera más elaborada y cuidadosa.

#### 1.4. Planeación de alternativa(s)

En la tabla 2 se muestra el cronograma de actividades que se planteó y siguió durante el semestre para alcanzar los objetivos de solución de las problemáticas identificadas. Estas propuestas se realizaron en conjunto con el equipo para comenzar con la estandarización de protocolos de documentación y procesos de laboratorio para así dejar una ruta sugerida a seguir en las siguientes etapas del PAP. El cronograma se basó en objetivos y el periodo de tiempo que nos tomó realizarlo, esto con la finalidad de permitir evaluar nuestra eficiencia y

efectividad de esta primera etapa. Se sugiere establecer la presentación en diseño de cronograma para gestionar estrategias y tomar decisiones informadas en pro de la organización y el equipo de trabajo.

Tabla 2. Cronograma de actividades

Semana	Actividad	Objetivo	Duración
1 y 2	Planeación de trabajo semestral	Organizar el trabajo para poder distribuir los manuales, artículos a presentar, temas de artículo de revisión, etc.	15 de enero al 26 de enero
3	Trabajo individual de elaboración de manuales e investigación personal	Elaborar un manual detallado sobre cada procedimiento para realizar el estudio de microbiota: Documentación y resguardo de muestras, determinación de dieta en niños, manejo de muestras biológicas infecciosas, manejo y disposición de RPBI, mediciones antropométricas, extracción de ADN de heces, estandarización de primers, electroforesis de ADN, PCR en punto final, PCR en tiempo real y análisis de datos de PCR en tiempo real.	29 de enero al 3 de marzo
4	Visita a laboratorios de biotecnología y nutrición	Familiarizarse con los laboratorios que se utilizarían, sus protocolos de ingreso y uso de equipos.	29 de enero
4	Entrega en canvas de primer avance de RPAP	Mostrar avance en investigación de la Organización, problemática y manejo de muestras biológicas infecciones de humanos.	9 de febrero
5, 6 y 7	Mentoría grupal sobre estandarización de procedimientos de laboratorio y toma de muestra	Preguntar dudas sobre la creación de los manuales de cada procedimiento.	12 de febrero al 26 de febrero
8	Esterilización de materiales	Preparar el material para comenzar con la estandarización de los procedimientos.	7 de marzo

9	Extracción de ADN de heces	Llevar a cabo la estandarización de la extracción de ADN de heces.	11 de marzo
12,13 y 14	Estandarización de primers	Preparar termograma, máster mix, correr PCRs punto final y analizar los resultados en geles de electroforesis.	9 de abril al 29 de abril
12,13,14 y 15	Estandarización de primers	Analizar si es necesario hacer ajustes en las temperaturas de alineamiento de las PCRs para repetir procedimiento y geles de electroforesis.	9 de abril al 29 de abril
12	Visita y presentación en ONI	Presentar el proyecto y su importancia a los integrantes del equipo de ONI para aclarar dudas entre ambas partes y ponerse de acuerdo con la logística de recolección de heces.	10 de abril
13, 14 y 15	Obtención de resultados de experimentación y trabajo en documentos finales	Trabajar en investigación de posibles errores en la metodología para reportar en RPAP.	15 de abril al 3 de mayo
14	Presentación en línea con ONI	Dar pequeña capacitación sobre las recomendaciones que se deben dar al tomar la muestra de heces.	24 de abril
15	Entrega final de RPAP Entrega final de manuales de procedimientos	Documentar lo aprendido en el PAP, lo que se desarrolló y los resultados obtenidos junto con posibles perspectivas.	3 de mayo
15 y 16	Visita a centro de atención de ONI	Tomar las medidas antropométricas y aplicar los cuestionarios y encuestas nutricionales a NN beneficiarios de ONI.	2 y 8 de mayo
17	Presentación final con ITESO	Mostrar un resumen de los resultados obtenidos durante el semestre tanto en temas técnicos de extracción de ADN de heces y estandarización de primers, como de	9 de Mayo

		documentación, antropometría y reuniones con ONI.	
--	--	---	--

## 1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

A continuación, se presenta el desarrollo de los manuales de procedimientos, estandarización de la extracción de ADN, estandarización de primers por PCR en punto final, una visita introductoria del proyecto en la asociación de ONI y la presentación de un artículo de revisión sobre microbiota.

### 1.5.1 Manuales de procedimientos

Se elaboraron manuales de procedimientos para las etapas preanalítica, analítica y post-analítica del proyecto de investigación, con el fin de tener la metodología establecida para trabajar en laboratorio y adaptarlos según el manejo de residuos biológicos infecciosos. Los manuales se trabajaron en base al formato manual de prácticas de laboratorio utilizado en los departamentos Biotecnología del ITESO, el cual comprende información desde presentación de lo que va cada manual, disposiciones generales de seguridad, registro de equipos y materiales utilizados, reactivos utilizados, procedimientos y/o técnicas, referencias de consulta, y contenidos específicos de cada actividad. Estos se desarrollaron basándose en artículos científicos donde se realizaron procedimientos similares, insertos de reactivos utilizados, metodologías estandarizadas, entre otros recursos electrónicos. Los manuales son indispensables para trabajar bajo métodos que nos permitan asegurar la replicabilidad de resultados.

### 1.5.2 Estandarización de la extracción de ADN

Se realizó la estandarización de la extracción de ADN con dos muestras tomadas de niños voluntarios familiares del equipo PAP. El protocolo inicial de extracción según el Kit DNA Stool Mini Kit QIAGEN se llevó a cabo según el orden mostrado en la figura 1. La extracción del ADN general para todos los microorganismos consiste en hacer primeramente una lisis celular, después la purificación y por último su almacenamiento (Osorio et al., 2009). El protocolo detallado para la extracción describe los métodos para separar sustancias inhibidoras del ADN, digestión de las proteínas, adherencia del ADN a la membrana de sílice

QIAamp, lavado de impurezas y la elución del ADN puro en columnas de centrifugación QIAamp Mini.



Figura 1. Protocolo de extracción de ADN

### 1.5.3 Estandarización de primers por PCR punto final

La amplificación por PCR se utilizó para determinar de forma cualitativa la presencia de ADN de 19 microorganismos objetivo potencialmente presentes en microbiota infantil (tabla 3). Estos fueron propuestos por las doctoras Sarah Ratkovich, Mariana Ruiz y Anayeli Patiño, responsables de la dirección del PAP Programa de desarrollo tecnológico para la sustentabilidad ambiental energética y alimentaria I. Los autores del presente RPAP se ocuparon de los que están resaltados en gris en la tabla 3. Sin embargo, sólo se comenzó a estandarizar con los siguientes microorganismos debido al corto periodo de tiempo para trabajar en laboratorio: Bacteroidetes, Firmicutes, *Lactococcus lactis*, *Clostridium coccoides*, *Eubacterium halli*, *Roseburia sp* y *Blautia*.

Tabla 3. Microorganismos objetivo del proyecto

Microorganismo	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')	pb	Tm	Phylum
Bacterias	AGTTTGATCCTGGCTCAG	GWATTACCGCGGCKGCTG	516	54.9	
Actinobacterias	TACGGCCGCAAGGCTA	TCRTCCCCACCTTCCTCCG	300	57	
Bacteroidetes	GGARCATGTGGTTTAATTCGAT GAT	AGCTGACGACAACCATGCA G	124	56.4	
Firmicutes	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAA GCA	AGCTGACGACAACCATGCA C	127	57.4	
Proteobacterias	TCGTCAGCTCGTGYTGTA	CGTAAGGGCCATGATG	155	56	
<i>Enterobacteriaceae</i>		TTACCGCGGCTGCTGGCAC	333	59	Proteobacterias
<i>Prevotella</i>	CACCAAGGCGACGATCA	GGATAACGCCCGGACCT	283	56.2	Bacteroidetes
<i>Akkermansia muciniphila</i>	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	329	59.5	Actinobacterias
<i>Lactobacillus lactis</i>	AGCAGTAGGGAATCTTCGGCA	GGGTAGTTACCGTCACTTGA TGAG	143	57.5	Firmicutes
<i>Clostridium leptum</i> (grupo IV)	CCTTCCGTGCCSAGTTA	GAATTAAACCACATACTCCA CTGCTT	116	60	Firmicutes
<i>Clostridium coccooides</i> (grupo XIVa)	GACGCCGCGTGAAGGA	AGCCCCAGCCTTTCACATC	200	56	Firmicutes
<i>Eubacterium hallii</i>	GCGTAGGTGGCAGTGCAA	GCACCGRAGCCTATAACGG	278	57.7	Firmicutes
<i>Roseburia sp</i>	TACTGCATTGGAAACTGTCG	CGGCACCGAAGAGCAAT	230	54.4	Firmicutes
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	GATGGCCTCGCGTCCGATTAG	CCGAAGACCTTCTCCTC	198	57	Firmicutes
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CTG GCA GCC GTG ACA CTA CT	TGA ACT GGC CGT TAC GGT CT	102	59.1	Actinobacterias
<i>Bifidobacterium breve</i>	TCA TCA CGG CAA GGT CAA GA	GGC CAG AAC AGC TGG AAC AA	111	57.3	Actinobacterias
<i>Bifidobacterium longum sub infantis</i>	ATG ATG CGC TGC CAC TGT TA	CGG TGA GCG TCA ATG TAT CT	132	56	Actinobacterias
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GCT GAT ATC TGC GCT GTA CC	AAA CCA CCC AGT AGT CCT CC	135	56	Actinobacterias
<i>Blautia</i>	CCTCCGACACTCTAGTMCGAC	CGGTACTGACTAAGAAGC	183	54.7	Firmicutes

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica que se utilizó para amplificar fragmentos específicos de material genético permitiendo obtener in vitro millones y millones de copias de fragmentos de ADN a partir de una molécula (Nazir, 2020). El termociclador un instrumento en el cual se llevó a cabo la PCR, alternó la temperatura desde un máximo de 95°C hasta un mínimo de 4°C para simular las condiciones en las que se llevaría a cabo la replicación en una célula común. Cada PCR se realizó de 25 a 35 ciclos con 3 temperaturas diferentes en cada uno de los ciclos. Cada ciclo constó de una temperatura de desnaturalización, una de alineamiento y finalmente una de extensión. La temperatura de alineamiento se probó con 5 opciones debido a que la enzima GoTaq® ADN polimerasa de Promega se optimiza según la Tm (temperatura de fusión) del conjunto de primers de cada microorganismo (se utilizó la del proveedor Integrated DNA technologies (IDT)), para posteriormente seleccionar la que tuviera mejores resultados de amplificación para las futuras PCRs (tabla 4 y figura 2).

Tabla 4. Temperaturas propuestas para la estandarización de PCR

Microorganismo	Temp.1	Temp. 2	Temp. 3 (T <sub>m</sub> )	Temp. 4	Temp. 5	C-
<i>Firmicutes</i>	51	53	55	57	59	57.5
<i>L. lactis</i>	54	56	58	60	62	54
<i>Roseburia sp.</i>	49.2	50.9	53	55.5	57.7	49.2
<i>Blautia</i>	49.2	50.9	53	55.5	57.7	49.2
<i>C. coccoides</i>	52	54	56	58	60	52
<i>Bacteroidetes</i>	56	58	60	62	64	56
<i>E. halli</i>	54	56	58	60	62	53

Reactivo	Volumen por tubo	Volumen Master mix
Buffer GoTaq	5 µL	20 µL
dNTPs	0.5 µL	3 µL
Primers FW/RV	1.5 µL	9 µL
ADN	0.125 µL	0.75 µL
Polimerasa		
H <sub>2</sub> O	15.875 µL	95.25 µL
ADN Template	2 µL	-

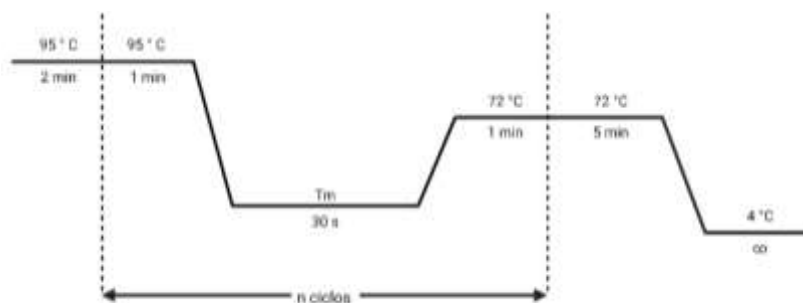


Figura 2. Volúmenes finales para 25 µL de reacción PCR por tubo y diseño de ciclo térmico (termograma) recomendado por el inserto de la enzima GoTaq® ADN (polimerasa).

Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis en geles de agarosa. Esta es una técnica que permitió separar fragmentos de ADN en función de su tamaño y poderlos observar a través de una tinción. El gel de agarosa contenía de 7 a 8 pocillos donde se cargaron las muestras de ADN y el marcador de peso molecular o ruler. Este gel se colocó en una caja molde y se sumergió en una cámara principal en un buffer con pH de 8. Esta cámara se colocó en una caja que tiene cargas positivas en un extremo y negativas en el otro. Debido a que la carga

del ADN es negativa (debido a los fosfatos que contiene), los fragmentos viajaron del polo negativo al positivo como se puede observar en la figura 3. Después de que se realizó la electroforesis se visualizó el gel a través de una lámpara de luz ultravioleta en el equipo fotodocumentador Gel Doc™ XR marca BIO-RAD, obteniendo así una imagen con bandas que corresponden a las muestras de ADN y el marcador de peso molecular (Austin, M.D, 2021).

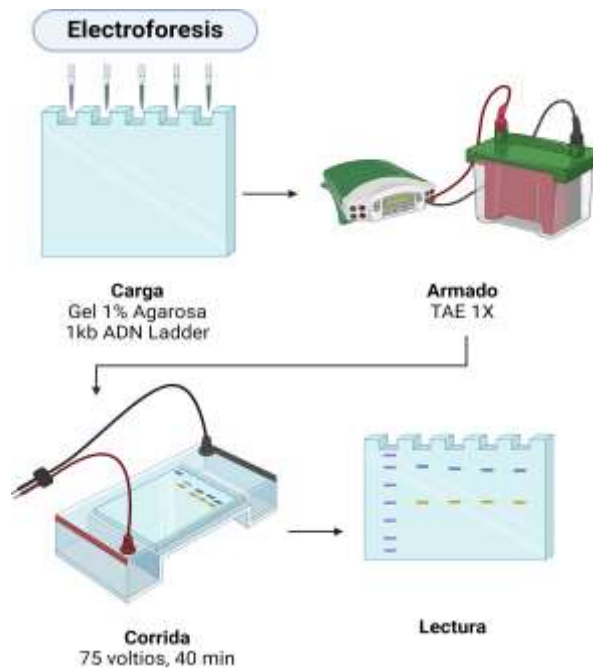


Figura 3. Metodología para realizar electroforesis de las muestras.

#### 1.5.4 Visita ONI (Organismo de Nutrición Infantil)

Se llevó a cabo una visita al Organismo de Nutrición Infantil en la sede ubicada en Blvd. Gral. Marcelino García Barragán 1280, en la cual algunos integrantes del equipo presentaron el proyecto a los integrantes de la asociación (profesionales de nutrición, psicología, entre otros). En la presentación se dio una pequeña introducción sobre la microbiota y su importancia en la primera infancia, se mencionó la relevancia de realizar esta investigación con los beneficiarios de ONI (NN en situación vulnerable), se les presentaron los objetivos del proyecto, las metodologías que se están utilizando y se utilizarán, el cronograma de actividades con el que se cuenta para los siguientes periodos escolares y las perspectivas del proyecto.

Dentro de la discusión que se abrió con el equipo ONI se tocaron temas como la manera en que llevan a cabo sus programas y cómo se podrán ajustar a la recolecta de muestras que se necesita para el proyecto, la cual debe ser en las mismas fechas que ONI maneja para la entrega de sus Onifórmulas y Onidiario que dan a los titulares de los niños. Se planteó que en estas entregas programadas que hacen en sus diferentes centros de atención se les dé a conocer a los padres a cerca del proyecto, se les entregue un consentimiento informado para firmar, así como los frascos para la muestra y se les pidan sus datos para contactarlos y llenar el pequeño historial sobre el paciente necesario para el estudio.

Además, se modificó la edad de la población de estudio, ya que se había tomado en cuenta que NN se encontrarían entre las edades de 6 a 10 años, mientras que los beneficiarios de la asociación se encuentran entre los 6 meses y 6 años de edad. Así mismo, el equipo de ONI mencionó las condiciones bajo las que algunos NN podrían encontrarse, como que podrían padecer alguna enfermedad intestinal sin haber sido tratada o que sí podría haber sido tratada con antibiótico y parálisis cerebral, esto con la finalidad de saber si podrían ser considerados en el estudio. Así mismo, el equipo hizo la petición de hacer posible la manera de que los resultados obtenidos se personalicen para dar recomendaciones a los padres de NN y que puedan hacer cambios para mejorar la calidad de vida de sus hijos e hijas.

### 1.5.5 Artículo de revisión

Se continúa trabajando en un artículo de revisión con el propósito de examinar y resumir la literatura existente sobre la microbiota intestinal y su relación con aspectos de metabolismo, dieta, patologías, probióticos, entre otras cosas. Fue fundamental para el avance de la investigación científica del proyecto y un soporte académico para futuras referencias. En el artículo de revisión se tienen los siguientes temas: aspectos generales de la microbiota, metabolitos microbianos, desarrollo de la microbiota en la vida (desde la etapa prenatal hasta la adolescencia), la relación que tiene la dieta con la microbiota, la relación que tiene el metabolismo con la microbiota, las diferentes patologías presentes en la microbiota, el contexto de la microbiota en niños mexicanos y el uso de probióticos, prebióticos y simbióticos.

El artículo de revisión está siendo elaborado por los estudiantes y las doctoras que imparten el PAP4D12. La recopilación y examinación de la información proporcionó una visión general y actualizada del estado del conocimiento del campo de la microbiota en NN. Así como, mostró las tendencias y brechas respecto a nuevas alternativas para poder intervenir en la salud intestinal de NN mexicanos, teniendo ya todo un contexto social que puede aportar información relevante en cuestión de los beneficios que estos puedan adquirir teniendo en cuenta la gran diversidad que simboliza la microbiota intestinal (apartado 1.8.8 de anexos generales).

#### 1.5.6 Visita en centro de atención de ONI para recabar datos

Para poder asistir a recabar datos y poder explicar cómo se debía tomar la muestra a los acompañantes de NN fue necesario llevar a cabo una investigación sobre la microbiota, misma que contribuyó a realizar el artículo de revisión. De esta manera, fue posible reconocer los temas requeridos para preguntar a los tutores sobre el historial contextual, clínico y alimenticio de NN. Además, se planteó un consentimiento informado donde los tutores de NN podrían firmar como autorización de uso de datos y muestras. En este documento se planteó la razón de llevar a cabo el estudio y los motivos por los cuales se pretendía recabar la información, así como la posibilidad de que si los tutores no quisieran continuar con el estudio pueden hacérselo saber a las encargadas de este. Finalmente, haciendo uso del manual de manejo de muestras biológicas infecciosas se hizo una infografía sobre las formas que hay para tomar muestras fecales, la cual se entregó y explicó a los tutores de NN para consultar en caso de tener dudas sobre la toma de muestra.

#### 1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

El proyecto se centró en dos enfoques principales para el desarrollo de distintos productos. Por un lado, se tuvo un enfoque interno destinado a establecer guías que mejoraran los procesos dentro del laboratorio y garantizaran una evaluación nutricional adecuada. Por otro lado, se adoptó un enfoque externo dirigido a comunicar a ONI y a los padres de familia o tutores los objetivos y metodologías del proyecto. Este enfoque buscaba asegurar una

comprensión clara y completa por parte de la organización sobre las actividades y contribuciones planificadas.

Para cumplir el objetivo del enfoque interno se elaboraron los manuales de procedimientos para las distintas fases del proyecto. Estos establecen una base sólida para el trabajo de laboratorio y servirán de guía para aquellos alumnos que se integren al proyecto, facilitando las actividades y garantizando prácticas adecuadas.

Además, se realizó la estandarización de la extracción de ADN y de los primers. Durante este proceso se tuvieron desafíos de organización, documentación y gestión del tiempo. Sin embargo, los resultados obtenidos permitieron observar que se requiere especial atención en preparar los equipos necesarios con antelación a la extracción de ADN para evitar que algunos pasos se lleven a cabo de manera incorrecta, como lo fue incubación a 70°C en la inhibición, cuando la temperatura debió ser de 95°C. Así mismo, es importante ajustar las temperaturas de alineamiento para los primers de cada microorganismo tomando en cuenta las recomendaciones del inserto brindado por el proveedor. Esto permitiría en un futuro mejores rendimientos de ADN para lograr amplificarlo y observar de forma cualitativa el estado de la microbiota en general.

Para cumplir con el objetivo del enfoque externo se creó material didáctico, como presentaciones en las que se comunicó a ONI la metodología del proyecto y su importancia. Así, la organización comprendió cómo la obtención de información sobre la microbiota intestinal de los niños que atienden puede ayudar a abordar específicamente la malnutrición en cada población. También se realizaron infografías a cerca de la toma de muestras de heces, las cuales fueron entregadas a los padres o tutores de los NN de ONI. El objetivo de esta infografía fue guiar a los padres para que realizaran una correcta obtención de muestras y reducir el riesgo de contaminación de las heces.

Como último producto, se realizó un artículo de revisión acerca de microbiota, su desarrollo en diferentes etapas de la vida, la influencia de la dieta, cómo está involucrada en el metabolismo y algunas patologías. Así mismo, se describe la influencia de la microbiota en

niños y niñas mexicanos. En general, el artículo destaca la relevancia de la microbiota en diversos aspectos de la salud y el bienestar. La realización del artículo de revisión genera un impacto significativo a nivel salud pública, ya que México enfrenta desafíos en este nivel debido a problemas de nutrición y obesidad. Comprender el impacto de la microbiota podría generar políticas de salud dirigidas a mejorar la salud de los NN mexicanos. Así mismo, sería posible generar estrategias de prevención de enfermedades más efectivas a partir de la nutrición infantil, lo cual tendría efectos en el desarrollo cognitivo y conductual de los NN.

### 1.7. Bibliografía y otros recursos

Austin, C., M. D. (2021). Electroforesis. Genome.gov.

<https://www.genome.gov/es/geneticsglossary/Electroforesis>

Endo A, Pärty A, Kalliomäki M, Isolauri E, Salminen S. 2014. Long-term monitoring of the human intestinal microbiota from the 2nd week to 13 years of age. *Anaerobe*. 28:149–156. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.06.006.

Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2014). *Bacteroides* and *Prevotella*. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 203-208). Elsevier Inc.

Jeong, H., Kim, S., Hwang, U.-S., Choi, H., & Park, Y.-S. (2023). Immunostimulatory Activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CAB701 Isolated from Jeju Cabbage. *Microorganisms*, 11(7), 1718.

Kurakawa, T., Ogata, K., Matsuda, K., Tsuji, H., Kubota, H., Takada, T., ... & Nomoto, K. (2015). Diversity of intestinal *Clostridium coccoides* group in the Japanese population, as demonstrated by reverse transcription-quantitative PCR. *PLoS One*, 10(5), e0126226.

Ley General de Salud, [L.G.S], Reformada, Diario Oficial de la Federación [D.O.F], 26 de marzo de 2024, (México).

Li, T. T., Tian, W. L., & Gu, C. T. (2021). Elevation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* to the species level as *Lactococcus cremoris* sp. nov. and transfer of *Lactococcus*

*lactis* subsp. *tractae* to *Lactococcus cremoris* as *Lactococcus cremoris* subsp. *tractae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(3), 004727.

Liu, X., Mao, B., Gu, J., Wu, J., Cui, S., Wang, G.,... Chen, W. (2021). *Blautia*: ¿un nuevo género funcional con posibles propiedades probióticas? *Microbios intestinales*, 13 (1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>

Marx, T. (2015). Immunoprotective effects of probiotics in the elderly. In *Foods and dietary supplements in the prevention and treatment of disease in older adults* (pp. 363-372). Elsevier.

Mbaye, B., Alou, M. T., Fadlane, A., Fregiere, L., Alibar, S., Million, M., . . . Lo, C. I. (2021). *Neobacillus massiliamazoniensis* sp. nov., a new bacterial species isolated from stool sample of an inhabitant of the Amazon region. *New Microbes and New Infections*, 42, 100900.

Mukherjee, A., Lordan, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2020). Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health. *Gut microbes*, 12(1), 1802866.

Nazir, I. (2020). Polymerase Chain Reaction. Available at SSRN 3603640.

Ochoa, C. (2013). La biota intestinal, el metabolismo energético, y la Diabetes mellitus. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 23(1), 113-129.

Organismo de Nutrición Infantil. (2023). Informe anual 2022. Organismo de Nutrición Infantil: <https://www.oni.org.mx/info/Informe-anual-2022-interactivo.pdf>

Osorio-Cadavid, Esteban; Ramírez, Mauricio; Andrés López, William; Mambuscay, Luz Adriana. (2009) Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XI, núm. 1, pp. 125- 131. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77612900013.pdf>

QIAGEN. (2010). QIAamp® DNA Stool Handbook. QIAGEN. <https://labettor.com/uploads/products/protocols/272.pdf>

- Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, [R.L.G.S.M.I.S], Reformada, Diario Oficial de la Federación [D.O.F], 2 de abril de 2014, (México).
- Roswall, J., Olsson, LM, Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, S., Tremaroli, V., Simon, MC, et al. (2021). Trayectoria de desarrollo de la microbiota intestinal humana sana durante los primeros 5 años de vida. *Microbio huésped celular* 29, 765–76 e3. doi: 10.1016/j.chom.2021.02.021
- Secretaría de Salud. (2003). NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. Ciudad de México, México: Diario Oficial de la Federación. Recuperado de: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=704675&fecha=17/02/2003#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=704675&fecha=17/02/2003#gsc.tab=0)
- Secretaría de Salud. (2012). NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico. Ciudad de México, México: Diario Oficial de la Federación. Recuperado de: <http://diariooficial.segob.gob.mx/normasOficiales.php?codp=4909&view=si#gsc.tab=0>
- Secretaría de Salud. (2013). NOM-012-SSA3-2012, Criterios para la atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio, y de la persona recién nacida. Ciudad de México, México: Diario Oficial de la Federación. Recuperado de: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013#gsc.tab=0)
- Secretaría de Salud. (2017). NOM-037-SSA3-2016, Procedimientos y criterios para la prestación del servicio de atención médica en unidades de atención médica integrada al Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. Ciudad de México, México: Diario Oficial de la Federación. Recuperado de: [https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6428/salud12\\_C/salud12\\_C.html](https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6428/salud12_C/salud12_C.html)
- Secretaría del Trabajo y Previsión Social. (1999). NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo,

transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas. Ciudad de México, México: Diario Oficial de la Federación. Recuperado de:  
[https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4943543&fecha=02/02/1999#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4943543&fecha=02/02/1999#gsc.tab=0)

Stephenson, F. H. (2016). *Calculations for molecular biology and biotechnology*. Academic press.

Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S. B., ... & Jolivet-Gougeon, A. (2017). *Roseburia* spp.: a marker of health?. *Future microbiology*, 12(2), 157-170.

Vaiserman, A., Romanenko, M., Piven, L., Moseiko, V., Lushchak, O., Kryzhanovska, N., . . . Koliada, A. (2020). Differences in the gut Firmicutes to Bacteroidetes ratio across age groups in healthy Ukrainian population. *BMC microbiology*, 20, 1-8.

Walrath, T., Dyamenahalli, K. U., Hulsebus, H. J., McCullough, R. L., Idrovo, J., Boe, D. M., Kovacs, E. J. (2020). Age-related changes in intestinal immunity and the microbiome. *Journal of Leukocyte Biology*, 109(6), 1045–1061.  
doi:10.1002/jlb.3ri0620-405rr

World Health Organization. (2016). *Sistema de gestión de la calidad en el laboratorio: Manual*. New York: World Health Organization. Recuperado de:  
<https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241548274>

World Medical Association. (2013). *World Medical Association Declaration of Helsinki ethical principles for medical research involving human subjects*. *JAMA: Journal of the American Medical Association*, 310(20), 2191-2194.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. *BMC bioinformatics*, 13, 1-11.

## 1.8. Anexos generales

### 1.8.1 Portada de algunos manuales realizados

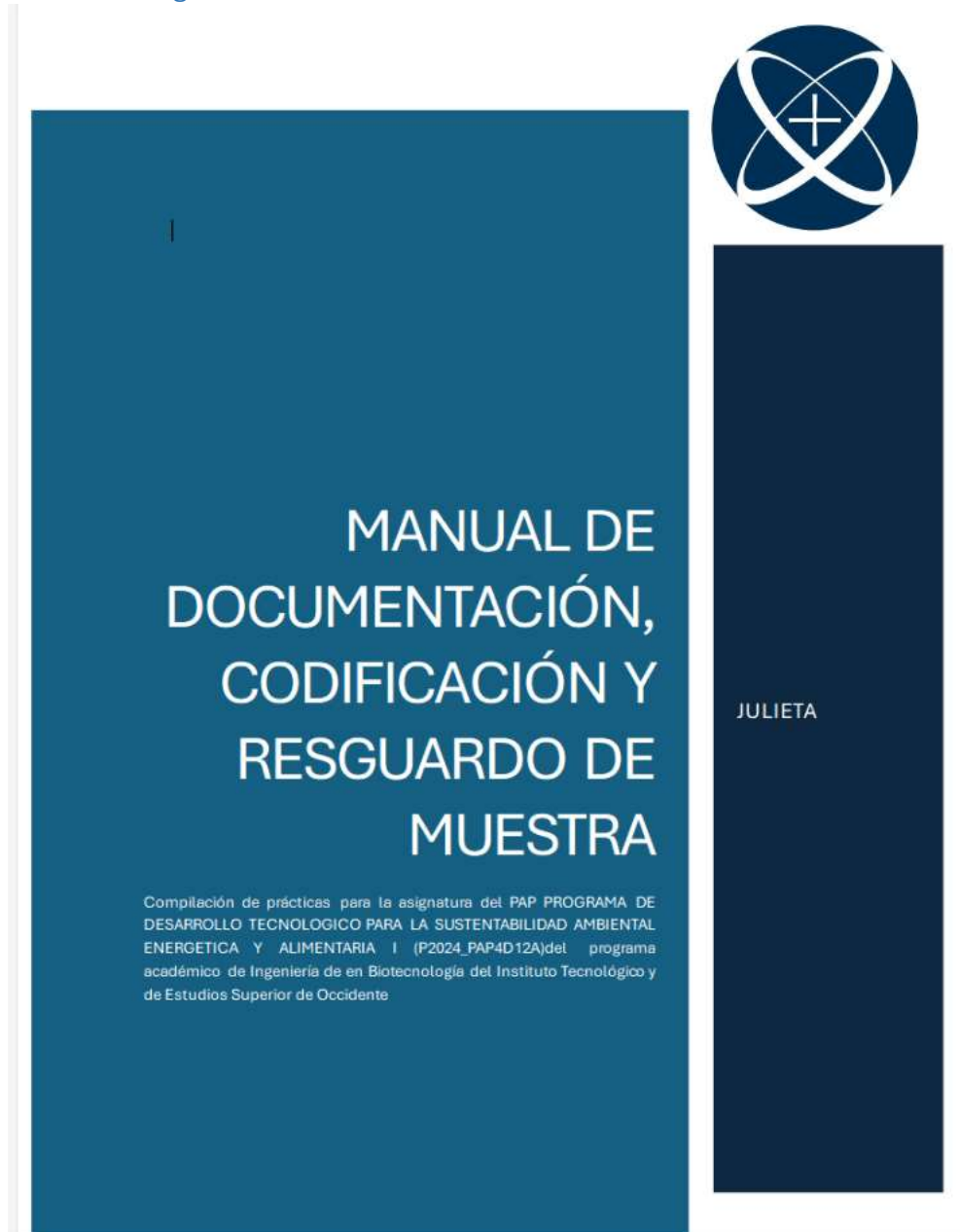


Figura 4. Portada del manual de documentación, codificación y resguardo de muestras.

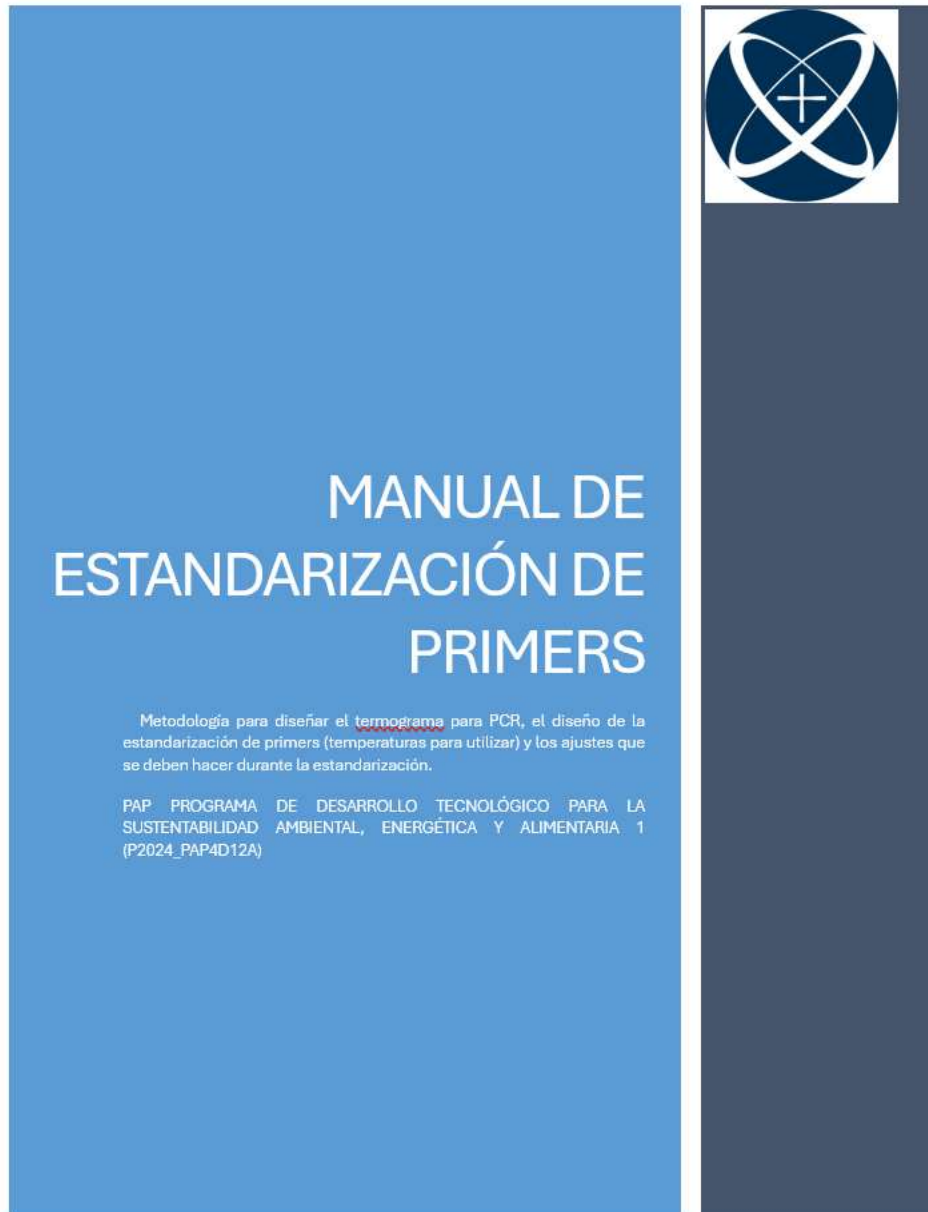


Figura 5. Portada del manual de estandarización de primers.

## 1.8.2 Primer BLAST

### Roseburia

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TACTGCATTGGAAACTGTCC	20	56.08	45.00	4.00	2.00
Reverse primer	CGGCACCGAAGAGCAAT	17	57.64	58.82	4.00	2.00
<b>Products on target templates</b>						
»NZ_LR999011.1 Roseburia hominis isolate MGYG-HBUT-02517 chromosome 1						
product length = 230						
Forward primer	1	TACTGCATTGGAAACTGTCC	20			
Template	1035997	.....	1036016			
Reverse primer	1	CGGCACCGAAGAGCAAT	17			
Template	1036226	.....	1036210			
product length = 230						
Forward primer	1	TACTGCATTGGAAACTGTCC	20			
Template	626507	.....	626526			
Reverse primer	1	CGGCACCGAAGAGCAAT	17			
Template	626736	.....	626720			
product length = 230						
Forward primer	1	TACTGCATTGGAAACTGTCC	20			
Template	26078	.....	26097			
Reverse primer	1	CGGCACCGAAGAGCAAT	17			
Template	26307	.....	26291			
product length = 230						
Forward primer	1	TACTGCATTGGAAACTGTCC	20			
Template	3096808	.....	3096789			
Reverse primer	1	CGGCACCGAAGAGCAAT	17			
Template	3096579	.....	3096595			
product length = 3258						
Forward primer	1	TACTGCATTGGAAACTGTCC	20			
Template	983393	A.T.A.....T	983374			
Reverse primer	1	CGGCACCGAAGAGCAAT	17			
Template	980136	AC..C.G.C.....	980152			
product length = 1017						
Forward primer	1	TACTGCATTGGAAACTGTCC	20			
Template	1024286	...GC.G.....A...A	1024305			
Reverse primer	1	CGGCACCGAAGAGCAAT	17			
Template	1025302	TC.....CTT.....	1025286			

Figura 6. Evidencia Primer Blast de *Roseburia*.

## *Blautia*

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTCCGACACTCTAGTNCGAC	21	58.27	60.00	4.00	2.50
Reverse primer	CGGTACCTGACTAAGAAGC	19	54.75	52.63	6.00	2.00
Products on target templates						
>NZ_CP092473.1 Roseburia rectibacter strain NSJ-69 chromosome, complete genome						
product length = 183						
Forward primer	1	CCTCCGACACTCTAGTNCGAC	21			
Template	3923493	.....C....	3923513			
Reverse primer	1	CGGTACCTGACTAAGAAGC	19			
Template	3923675	.....	3923657			
product length = 183						
Forward primer	1	CCTCCGACACTCTAGTNCGAC	21			
Template	3195213	.....C....	3195233			
Reverse primer	1	CGGTACCTGACTAAGAAGC	19			
Template	3195395	.....	3195377			
product length = 183						
Forward primer	1	CCTCCGACACTCTAGTNCGAC	21			
Template	111621	.....C....	111641			
Reverse primer	1	CGGTACCTGACTAAGAAGC	19			
Template	111803	.....	111785			
>NZ_LR699011.1 Roseburia hominis isolate MGYG-HGUT-02517 chromosome 1						
product length = 183						
Forward primer	1	CCTCCGACACTCTAGTNCGAC	21			
Template	3096772	.....C....	3096792			
Reverse primer	1	CGGTACCTGACTAAGAAGC	19			
Template	3096954	.....	3096936			
>NZ_LR027880.1 Roseburia intestinalis L1-82 chromosome 1, complete sequence						
product length = 183						
Forward primer	1	CCTCCGACACTCTAGTNCGAC	21			
Template	3944346	.....C....	3944366			
Reverse primer	1	CGGTACCTGACTAAGAAGC	19			
Template	3944528	.....	3944510			
product length = 183						
Forward primer	1	CCTCCGACACTCTAGTNCGAC	21			
Template	3563907	.....C....	3563927			
Reverse primer	1	CGGTACCTGACTAAGAAGC	19			
Template	3564089	.....	3564071			

Figura 7. Evidencia Primer Blast de *Blautia*.

## Firmicutes

### Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGAGNATGTGGTTTAATTCGAAGCA	25	60.39	41.67	6.00	4.00
Reverse primer	AGCTGACGACAACCATGCAC	20	61.23	55.00	4.00	2.00

### Products on target templates

>NZ\_VUMD01000060.1 Clostridium porci strain WCA-389-WT-23D1 seq60, whole genome shotgun sequence

product length = 127

Forward primer 1 GGAGNATGTGGTTTAATTCGAAGCA 25  
Template 932 ....C..... 956

Reverse primer 1 AGCTGACGACAACCATGCAC 20  
Template 1058 ..... 1039

>NZ\_VUNI01000057.1 Roseburia porci strain MUC/MUC-530-WT-4D seq58, whole genome shotgun sequence

product length = 127

Forward primer 1 GGAGNATGTGGTTTAATTCGAAGCA 25  
Template 933 ....C..... 957

Reverse primer 1 AGCTGACGACAACCATGCAC 20  
Template 1059 ..... 1040

>NZ\_CP030280.1 Blautia argi strain KCTC 15426 chromosome, complete genome

product length = 127

Forward primer 1 GGAGNATGTGGTTTAATTCGAAGCA 25  
Template 624659 ....C..... 624683

Reverse primer 1 AGCTGACGACAACCATGCAC 20  
Template 624785 ..... 624766

product length = 127

Forward primer 1 GGAGNATGTGGTTTAATTCGAAGCA 25  
Template 3174580 ....C..... 3174556

Reverse primer 1 AGCTGACGACAACCATGCAC 20  
Template 3174454 ..... 3174473

>NZ\_PYLP01000049.1 Faecalibacillus faecis strain SNUG30370 scaffold\_49, whole genome shotgun sequence

product length = 123

Forward primer 1 GGAGNATGTGGTTTAATTCGAAGCA 25  
Template 747 ....C..... 771

Reverse primer 1 AGCTGACGACAACCATGCAC 20  
Template 869 ..... 850

Figura 8. Evidencias Primer Blast de Firmicutes.

## *L.lactis*

### Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGCAGTAGGGAATCTTCGGCA	21	61.24	52.38	4.00	1.00
Reverse primer	GGGTAGTTACCGTCACTTGATGAG	24	60.68	50.00	7.00	2.00

#### Products on target templates

>NZ\_CP021150.1 Lactococcus lactis subsp. lactis strain 1484 chromosome, complete genome

product length = 143

Forward primer 1 AGCAGTAGGGAATCTTCGGCA 21  
Template 488993 ..... 489013

Reverse primer 1 GGGTAGTTACCGTCACTTGATGAG 24  
Template 489135 ..... 489112

product length = 143

Forward primer 1 AGCAGTAGGGAATCTTCGGCA 21  
Template 2578754 ..... 2578734

Reverse primer 1 GGGTAGTTACCGTCACTTGATGAG 24  
Template 2578612 ..... 2578635

product length = 143

Forward primer 1 AGCAGTAGGGAATCTTCGGCA 21  
Template 2521886 ..... 2521866

Reverse primer 1 GGGTAGTTACCGTCACTTGATGAG 24  
Template 2521744 ..... 2521767

>NC\_022369.1 Lactococcus cremoris subsp. cremoris KW2, complete sequence

product length = 143

Forward primer 1 AGCAGTAGGGAATCTTCGGCA 21  
Template 500456 ..... 500476

Reverse primer 1 GGGTAGTTACCGTCACTTGATGAG 24  
Template 500598 ..... 500575

product length = 143

Forward primer 1 AGCAGTAGGGAATCTTCGGCA 21  
Template 2425883 ..... 2425863

Reverse primer 1 GGGTAGTTACCGTCACTTGATGAG 24  
Template 2425741 ..... 2425764

product length = 143

Forward primer 1 AGCAGTAGGGAATCTTCGGCA 21  
Template 2402395 ..... 2402375

Reverse primer 1 GGGTAGTTACCGTCACTTGATGAG 24  
Template 2402253 ..... 2402276

Figura 9. Evidencias Primer Blast de *L.lactis*.

*E. Halli*

Primer pair 1						
		Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer		GCGTAGGTGGCAGTGCAA	18	60.67	61.11	5.00
Reverse primer		GCACCGNAGCCTATACGG	18	58.03	64.71	4.00

product length = 278

Forward primer	1	GCGTAGGTGGCAGTGCAA	18
Template	11618	.....	11635

Reverse primer	1	GCACCGNAGCCTATACGG	18
Template	11895	.....G.....	11878

product length = 278

Forward primer	1	GCGTAGGTGGCAGTGCAA	18
Template	820426	.....	820443

Reverse primer	1	GCACCGNAGCCTATACGG	18
Template	820703	.....A.....	820686

product length = 278

Forward primer	1	GCGTAGGTGGCAGTGCAA	18
Template	1185718	.....	1185735

Reverse primer	1	GCACCGNAGCCTATACGG	18
Template	1185995	.....A.....	1185978

product length = 278

Forward primer	1	GCGTAGGTGGCAGTGCAA	18
Template	1722014	.....	1722031

Reverse primer	1	GCACCGNAGCCTATACGG	18
Template	1722291	.....A.....	1722274

Figura 10. Evidencias Primer Blast de *E. halli*.

*C. coccoides*

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GACGCCCGTGAAGGA	16	56.72	68.75	7.00	0.00
Reverse primer	AGCCCCAGCCTTTCACATC	19	60.00	57.89	3.00	0.00

Products on target templates

>NZ\_AP024846.1 [Clostridium] scindens strain GTD chromosome, complete genome

product length = 199

Forward primer 1 GACGCCCGTGAAGGA 16  
 Template 15362 ..... 15377

Reverse primer 1 AGCCCCAGCCTTTCACATC 19  
 Template 15560 .....G.G..... 15542

product length = 199

Forward primer 1 GACGCCCGTGAAGGA 16  
 Template 123678 ..... 12385

Reverse primer 1 AGCCCCAGCCTTTCACATC 19  
 Template 123868 .....G.G..... 123850

product length = 199

Forward primer 1 GACGCCCGTGAAGGA 16  
 Template 918583 ..... 918598

Reverse primer 1 AGCCCCAGCCTTTCACATC 19  
 Template 918781 .....G.G..... 918763

product length = 199

Forward primer 1 GACGCCCGTGAAGGA 16  
 Template 2656887 ..... 2656072

Reverse primer 1 AGCCCCAGCCTTTCACATC 19  
 Template 2655889 .....G.G..... 2655907

>NZ\_AP025566.1 [Clostridium] hylemoniae strain CE91-S063 chromosome, complete genome

product length = 199

Forward primer 1 GACGCCCGTGAAGGA 16  
 Template 57674 ..... 57689

Reverse primer 1 AGCCCCAGCCTTTCACATC 19  
 Template 57872 .....G.G.....T.. 57854

product length = 199

Forward primer 1 GACGCCCGTGAAGGA 16  
 Template 196513 ..... 196528

Reverse primer 1 AGCCCCAGCCTTTCACATC 19  
 Template 190711 .....G.G.....T.. 196693

product length = 199

Forward primer 1 GACGCCCGTGAAGGA 16  
 Template 634184 ..... 634119

Reverse primer 1 AGCCCCAGCCTTTCACATC 19  
 Template 634382 .....G.G.....T.. 634284

product length = 199

Forward primer 1 GACGCCCGTGAAGGA 16  
 Template 1873451 ..... 1873466

Reverse primer 1 AGCCCCAGCCTTTCACATC 19  
 Template 1873649 .....G.G.....T.. 1873631

Figura 11. Evidencias Primer Blast de *C. coccoides*.

*Bacteroidetes*

Primer pair 1					
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	GGANCATGTGGTTAAATTCGATGAT	25	55.99	37.50	4.00
Reverse primer	AGCTGACGACAACCATGCGAG	20	60.95	35.00	4.00
Products on target templates					
-NC_01920887.1 <i>Aerospira angulata</i> strain EL160428 chromosome, complete genome					
product length = 128					
Forward primer	1 GGANCATGTGGTTAAATTCGATGAT 25				
Template	215612 ...G..... 215638				
Reverse primer	1 AGCTGACGACAACCATGCGAG 20				
Template	215737 ..... 215718				
product length = 128					
Forward primer	1 GGANCATGTGGTTAAATTCGATGAT 25				
Template	5883547 ...G..... 5883221				
Reverse primer	1 AGCTGACGACAACCATGCGAG 20				
Template	5883422 ..... 5883441				
product length = 126					
Forward primer	1 GGANCATGTGGTTAAATTCGATGAT 25				
Template	5756888 ...G..... 5756994				
Reverse primer	1 AGCTGACGACAACCATGCGAG 20				
Template	5755963 ..... 5755982				
product length = 126					
Forward primer	1 GGANCATGTGGTTAAATTCGATGAT 25				
Template	4697942 ...G..... 4697938				
Reverse primer	1 AGCTGACGACAACCATGCGAG 20				
Template	4697837 ..... 4697856				
-NC_0492910000001.1 <i>Ferribacteroides garbini</i> strain PDAAR005_1322 stg s1 0000009_arrow_pilon, whole genome shotgun sequence					
product length = 126					
Forward primer	1 GGANCATGTGGTTAAATTCGATGAT 25				
Template	3853858 ...A..... 3853874				
Reverse primer	1 AGCTGACGACAACCATGCGAG 20				
Template	3853179 ..... 3853156				
product length = 126					
Forward primer	1 GGANCATGTGGTTAAATTCGATGAT 25				
Template	3597737 ...A..... 3597761				
Reverse primer	1 AGCTGACGACAACCATGCGAG 20				
Template	3597862 ..... 3597843				
product length = 126					
Forward primer	1 GGANCATGTGGTTAAATTCGATGAT 25				
Template	3211338 ...A..... 3211382				
Reverse primer	1 AGCTGACGACAACCATGCGAG 20				
Template	3211483 ..... 3211464				
product length = 126					
Forward primer	1 GGANCATGTGGTTAAATTCGATGAT 25				
Template	3153948 ...A..... 3153973				
Reverse primer	1 AGCTGACGACAACCATGCGAG 20				
Template	3154074 ..... 3154055				
product length = 126					
Forward primer	1 GGANCATGTGGTTAAATTCGATGAT 25				
Template	1084383 ...A..... 1084279				
Reverse primer	1 AGCTGACGACAACCATGCGAG 20				
Template	1084396 ..... 1084349				

Figura 12. Evidencias Primer Blast de Bacteroidetes.

### 1.8.3 Presentación en ONI del proyecto



Figura 13. Portada de la presentación del proyecto y cronograma de actividades al Organismo de Nutrición Infantil.

### 1.8.4 Presentación en línea de toma de muestra e infografía



Figura 14. Portada de la presentación en línea para ONI sobre cómo recolectar la muestra de heces.



Figura 15. Infográfico que explica las maneras de tomar muestra de heces evitando contaminación con buenas prácticas.

### 1.8.5 Consentimiento informado y cuestionario de historial



Guadalajara, Jalisco, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 20 \_\_\_\_\_

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente autorizo que yo \_\_\_\_\_ o mi representado legal \_\_\_\_\_ participemos voluntariamente en el protocolo de investigación "ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN NIÑOS Y NIÑAS EN SITUACIÓN VULNERABLE". Registrado ante el Comité Local de \_\_\_\_\_ con número de aprobación de \_\_\_\_\_.

A lo largo de la vida, la microbiota intestinal es clave para mantener el equilibrio en la salud; principalmente en los primeros años de vida donde impacta en el desarrollo de niños y niñas. En la actualidad, la población infantil tiene una mala dieta y malos hábitos alimenticios, especialmente aquellos en situación vulnerable. Esta situación, junto con otros factores externos favorece la disminución de bacterias intestinales benéficas (probióticos), lo que ocasiona alteraciones metabólicas en edad temprana, afectando la calidad de vida y desarrollo.

El Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO) en colaboración con el Organismo de Nutrición Infantil (ONI) y el Centro Universitario de Tlaxiaco (CUTLAJO) de la Universidad de Guadalajara (UDG), determinar la composición de la microbiota intestinal del participante, así como la presencia de bacterias benéficas; además se analizará sus hábitos alimenticios y las medidas antropométricas. Se relacionarán los hábitos alimenticios y las medidas antropométricas con los niveles de probióticos de cada participante, con esto se buscarán estrategias de mejora de la salud intestinal del niño o niña. Al participar en nuestro estudio, está ayudando al desarrollo de nuevo conocimiento en relación a las interacciones de los alimentos con la microbiota y su impacto en el desarrollo de los niños y niñas.

Para esto, necesitamos que usted nos proporcione una muestra de heces de su hijo o tutorado, que será recolectada en frascos especiales el cual nosotros le proporcionaremos. La toma de la muestra de heces no representa riesgo alguno, si acaso incomodidad en el momento de recolectarla y transportarla a nuestro laboratorio; esta muestra será almacenada en el biobanco del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico, Molecular y Bioquímico (LaDiMMB) del CUTLAJO-UDG para que pueda ser utilizada en futuras investigaciones. Además, necesitaremos recolectar información acerca de los hábitos alimenticios e información familiar, así como las medidas antropométricas del niño o niña. La información recolectada será confidencial, de manera que los datos personales no se publicarán; se le asignará un folio y se codificará su muestra, ambos datos servirán como referencia en lugar de su nombre.

Como participante, me quedan claros los beneficios y riesgos de autorizar la participación en el presente proyecto y doy mi consentimiento para su realización. Sé también que puedo negarme a participar o retirarme en el estudio sin que afecte mi atención. Para fines que se estime convenientes, firmo la presente junto al investigador que me informo y dos testigos, conservando una copia. Contacto para cualquier duda o aclaración: Dra. Mariana del Rocío Ruiz Briseño Tel. 3313116171, correo: [marianaruib@iteso.mx](mailto:marianaruib@iteso.mx), [mariana.ruiz@academicos.udg.mx](mailto:mariana.ruiz@academicos.udg.mx); Dra. Sarah Ratkovich González Tel. 3314568586, correo: [sarah.ratkovich@iteso.mx](mailto:sarah.ratkovich@iteso.mx)

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del participante o tutor

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del que recibe el consentimiento

  
Dra. Mariana del Rocío Ruiz Briseño

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del investigador principal

  
Dra. Sarah Ratkovich González

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del investigador principal

Figura 16. Imagen del consentimiento informado mostrado a tutores de NN participantes.



### 1.8.6 Trabajo en laboratorio



Figura 18. Collage de algunos días de trabajo en laboratorio.

### 1.8.7 Muestra de carteles de presentación final PAP



Figura 19. Carteles para presentaciones finales sobre la estandarización llevada a cabo en el laboratorio y sobre la documentación llevada a cabo para estandarizar los procedimientos.

### 1.8.8 Avances de artículo de revisión



Figura 20. Evidencias de avances del artículo de revisión por los algunos integrantes del equipo.

## 2. Productos

### 2.1 Manuales de procedimientos

Con la finalidad de obtener información demográfica valiosa para la zona de Jalisco, México en cuanto a la microbiota intestinal de NN en situación vulnerable, estos manuales se basaron en las consideraciones bioéticas abordadas en el documento de la Ley general de Salud, la Declaración de Helsinki y la Ley General de Salud en Materia de Investigación. Los manuales se desglosan a continuación en la tabla 5 en donde se presenta un resumen y el responsable de su elaboración (portada de algunos manuales en anexos 1.8.1).

Tabla 5. Manuales realizados durante el semestre

<b>Nombre del manual</b>	<b>Descripción</b>	<b>Persona que lo elaboró</b>
<u>Documentación, codificación, y resguardo de muestras</u>	Sistema estandarizado para tener el historial organizado, contabilizado y documentado de todas las muestras de los participantes del estudio.	Julieta Eusebio Barreto
<u>Electroforesis de ADN</u>	Manual para saber cómo llevar a cabo la preparación de TAE, gel de agarosa, y el armado del equipo para correr los géles de electroforesis	Adrián Alberto Saldaña Mireles
<u>Mediciones antropométricas en niños y adolescentes</u>	Manual que muestra la manera en que se deben tomar las medidas antropométricas de los niños, así como los equipos que se deben utilizar y las consideraciones al momento de realizarlo.	Diana Laura Moreno Jiménez
<u>Estandarización de primers</u>	Manual para ayudar a diseñar el termograma y decidir las temperaturas y tiempos que se utilizarán en cada etapa. Menciona detalles sobre cada	Elvira Daniela Vázquez Cervantes

	etapa de la PCR y ejemplifica cómo se ven los geles cuando se deben hacer ajustes.	
<u>PCR punto final</u>	Describe la metodología que se debe llevar a cabo para realizar la PCR en punto final y la preparación del Máster mix basándose en el inserto de la enzima GoTaq DNA Polymerase 9PIM300.	Adrián Ruiz Chávez

## 2.2 Estandarización de la extracción de ADN

Los rendimientos obtenidos de la extracción de ADN se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Rendimientos de ambas muestras de ADN.

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad (ng)</b>	<b>Pureza (A260/A280)</b>
STD01	12	1.3
STD02	33	1.5

La pureza de ambas muestras calculada con el cociente de las absorbancias a 260 nm y 280 nm se encuentra por debajo del límite de 1.8 que se considera que la muestra está contaminada ya sea con proteínas (Stephenson, 2016), ácidos grasos o fenol, lo que la hace una muestra no viable. Por otro lado, la cantidad esperada de ADN era de 300 ng, por lo que se observa que se tiene una cantidad muy pobre de ADN finalizada la extracción; esto puede deberse a que en la metodología experimental la suspensión se calentó a 70° C y no a 95° C, lo que pudo ocasionar que no se rompieran las membranas celulares de las bacterias más resistentes (QIAGEN, 2010) y por ende el ADN no se extrajera de manera correcta, ocasionando una baja concentración de este y afectando también la pureza de las muestras. Esta baja concentración puede afectar a los siguientes procedimientos, ya que el ADN es esencial para las PCRs y las electroforesis.

### 2.3 Estandarización de primers por PCR punto final

Después de realizar el procedimiento de PCR el análisis por electroforesis en gel de agarosa permitió valorar la integridad de la muestra de ADN. Una muestra de ADN se considera íntegra cuando su perfil corresponde a bandas definidas. Como metodología extra se utilizó la herramienta bioinformática de Primer Blast (Basic Local Alignment Search Tool) para valorar la complementariedad de primers y la cercanía genética con otros microorganismos (Apartado 1.8.2 Primer Blast de Anexos generales). A continuación, se describen los resultados obtenidos de cada microorganismo evaluado por los autores del RPAP.

Julieta Eusebio Barreto:

#### Estandarización de primers para *Roseburia sp.*

El género *Roseburia* está formado por bacterias anaerobias grampositivas obligadas. Incluye cinco especies: *Roseburia intestinalis*, *R. hominis*, *R. inulinivorans*, *R. faecis* y *R. cecicola*. Los análisis filogenéticos han indicado una estrecha relación entre *E. rectale* y *Roseburia* y los miembros de Clostridiales y el género *Clostridium* de bacterias Gram-positivas. Las *Roseburia spp.* forman parte de las bacterias comensales que producen ácidos grasos de cadena corta, especialmente butirato, que afectan a la motilidad colónica, el mantenimiento de la inmunidad y las propiedades antiinflamatorias. Los cambios abruptos de colonización pueden afectar vías metabólicas y asociación a varias enfermedades como la obesidad, la diabetes tipo 2, alergias, entre otras. También puede ser un potencial probiótico de restauración de la flora intestinal beneficiosa (Tamanai-Shacoori *et al*, 2017).

La modulación de la colonización de *Roseburia* en el tracto digestivo con la edad tiene diferentes variables. Estudios recientes de Roswall *et al* 2021, han creado ciertos cortes de abundancia de microorganismos en 4 periodos de la vida de un niño de hasta 5 años. La que nos interesa en este caso por las edades de los donantes de muestras de heces son después de los 3 años, donde se observa un aumento de filos *Methanobrevibacter*, *Desulfovibrio*, *Bilophila* y algunos *Clostridia*. Dependiendo del contexto nutricional de los niños se van a aumentar o disminuir los géneros mencionados. En este caso, *Roseburia* se asocia al consumo de proteínas vegetales (Walrath,2020). El

resultado de la primera estandarización denota presencia de bandas de ADN definidas en el gel de agarosa para todas las temperaturas propuestas (figura 21). Se sugiere utilizar la temperatura promedio de 53 °C para las siguientes PCR.

#### Estandarización de primers para *Blautia*

*Blautia* es un género de bacterias anaerobias con propiedades probióticas. Mediante análisis de filogenia y fenotípica se han reclasificado algunas especies de *Clostridium* y *Ruminococcus* como *Blautia*, por lo que actualmente existen hasta 20 especies nuevas con nombres aprobados en este género. Su contribución a enfermedades inflamatorias y metabólicas, así como su actividad antibacteriana la posicionan como un organismo de interés en investigaciones e informes. Por ejemplo, *B. hydrogenotrophica* y *B. stercoris* se aislaron por primera vez de heces humanas; *B. wexlerae* y *B. luti* son las más abundantes de *Blautia* y están consideradas entre las especies dominantes del intestino humano (Liu *et al*, 2021).

Se han observado cambios significativos en la microbiota intestinal durante las distintas etapas de la vida, es decir, de infantes a adultos y adultos a vejez. Un estudio de microbiota intestinal que monitoreaba el comportamiento de *B. coccooides* en niños de 2 semanas a 13 años en donde se observó que en niños menores de 6 meses rara vez estaba presente este género. Sin embargo, era más común en los mayores a 12 años (Endo A *et al*, 2014). La complementariedad de estos primers es muy afín a microorganismos del género *Roseburia* que al igual que *Blautia* pertenecen a la clase *Clastridia*, específicamente a fragmentos de longitud de 183 pb como las especies *Roseburia rectibacter*, *Roseburia Hominis* y *Roseburia intestinalis* según el análisis con el software de Primer Blast (Ye *et al.*, 2012). El resultado de la primera estandarización denota presencia de bandas de ADN definidas en el gel de agarosa para todas las temperaturas propuestas (figura 21). Se sugiere utilizar la temperatura promedio de 55.5 °C para las siguientes PCR.

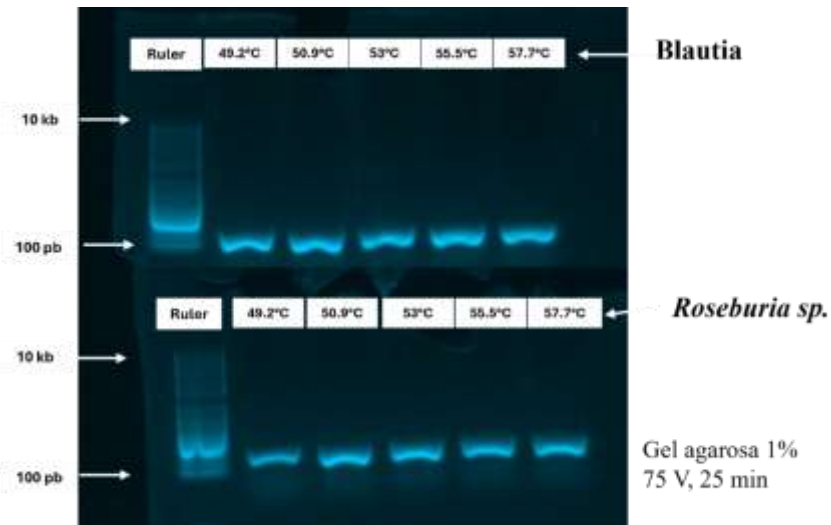


Figura 21. Gel de electroforesis para evaluar PCR de *Blautia* y *Roseburia sp.*

Elvira Daniela Vázquez Cervantes:

#### Estandarización de primers para Firmicutes

Firmicutes es uno de los filos más encontrados en el intestino humano. Este junto con Bacteroidetes representan el 99% de las bacterias del intestino. La mayoría de las bacterias del filo Firmicutes recae en dos grupos importantes: *Clostridium coccooides* (clúster XIVa) y *Clostridium leptum* (clúster IV). Se ha encontrado que el clúster XIVa disminuye con el aumento de la edad. Así mismo, este clúster se encarga de producir ácidos grasos de cadena corta por medio de la fermentación que estos producen en el intestino siendo el butirato uno de los más importantes ya que es la principal fuente de nutrientes de las células del epitelio intestinal (Marx, 2015). Un parámetro utilizado para medir la salud intestinal es el índice Firmicutes/Bacteroidetes, se ha demostrado que el aumento en la relación F/B se asocia a un mayor aprovechamiento energético de la fermentación colónica. Se ha encontrado que hay un decremento en la abundancia relativa de Firmicutes y un aumento de Bacteroidetes en ancianos (70-85 años), y esto se ha relacionado con un declive gradual de la función órganos y la capacidad de mantener la integridad de la barrera en las personas mayores (Vaiserman et al., 2020).

Se llevó a cabo un primer Blast analizando los primers degenerados utilizados para llevar a cabo la PCR de Firmicutes para un amplicón con un tamaño de 127 pb. Se encontró que estos pueden amplificar cepas de fragmentos entre 122 y 129 pb, siendo 127 pb el tamaño de amplicón más común entre los resultados del análisis. Algunas cepas encontradas

fueron: *Clostridium hydrogenum*, *Blautia argi*, *Eubacterium uniforme*, *Roseburia porci*, *Peptoniphilus faecalis*, *Waltera intestinalis*, *Faecalibacillus faecis*, *Ruminococcus difficilis*, *Lactococcus fujiensis*, entre otras (Ye *et al.*, 2012).

En la figura 22, se muestra el gel de agarosa para la primera estandarización del filo Firmicutes. Se pueden observar las bandas a temperaturas de alineamiento de 52°C a 60°C, mientras que se observa el control negativo contaminado por ADN debido a un error humano. Tomando en cuenta que el marcador de peso molecular va de 100 pb a 10kb se puede observar que se encontraron bandas cerca los 100 pb, lo cual indica que el tamaño de banda se acerca al tamaño de los fragmentos encontrados en el primer Blast para microorganismos que pertenecen al filo Firmicutes. En este caso, la temperatura seleccionada para ser utilizada como temperatura de alineamiento en PCRs futuras fue de 60°C, ya que la banda muestra mayor nitidez.

#### Estandarización de primers para *Lactococcus lactis*

*Lactococcus lactis* es una bacteria Gram positiva anaerobia facultativa, ácido-láctica conocida por su capacidad para sobrevivir a las duras condiciones del tracto gastrointestinal humano que es utilizada para fabricar productos lácteos como el queso y el suero de mantequilla. Pertenece al filo Firmicutes. Este organismo es conocido como seguro debido a su uso histórico en la fermentación de alimentos. Además, ha cobrado importancia como probiótico prometedor gracias a sus potenciales beneficios a la salud. *L. lactis* posee una amplia gama de capacidades inmunomoduladoras, que incluyen la mejora de la actividad de las células fagocíticas, la promoción de la producción de citoquinas proinflamatorias y la modulación de las vías de señalización inmunitaria e inflamatoria. *L. lactis* mantiene la homeostasis inmunitaria y evita reacciones inmunitarias excesivas o inapropiadas que pueden dañar al huésped mediante la manipulación de estas vías (Jeong *et al.*, 2023).

Se llevó a cabo un primer Blast analizando los primers utilizados para llevar a cabo la PCR de *Lactococcus lactis* para un amplicón de 143 pb. Se encontró que estos pueden amplificar las cepas: *Lactococcus cremoris* y *Neobacillus bataviensis*, ya que los primers se alinean completamente a secuencias del mismo tamaño (143 pb) que *L.lactis*. Así mismo, se encontró

que primer forward se alineó completamente a las siguientes cepas: *Streptococcus saliviloxodontae*, *Streptococcus loxodontisalivarius*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus caballi*, *Lactococcus hircilactis*, *Lactococcus taiwanensis*, mientras que el primer reverse no mostró un alineamiento total con las cepas mencionadas (Ye *et al.*, 2012).

De acuerdo con Li *et al.* (2021), *Lactococcus cremoris* es una subespecie de *L. lactis*. En cuestión de *Neobacillus bataviensis*, esta pertenece al género *Neobacillus* que a su vez pertenece a la familia *Bacillaceae* y el filo *Firmicutes* (Mbaye *et al.*, 2021).

En la figura 22, se muestra el gel de agarosa para primera estandarización de la cepa *L. lactis*. Se pueden observar las bandas a temperaturas de alineamiento de 53°C a 62°C. Además, se observan bandas cercanas a la banda del marcador de peso molecular que indica 100 pb, lo cual indica que las bandas presentadas obtenidas en la electroforesis son aproximadamente del tamaño mostrado por la literatura (143 pb). Así mismo, se observa una alta cantidad de dímeros de primers, esto puede ser explicado gracias a la alta auto complementariedad (4 y 7 para primer Forward y Reverse, respectivamente) encontrada entre los primers al realizar la PCR *in silico*.

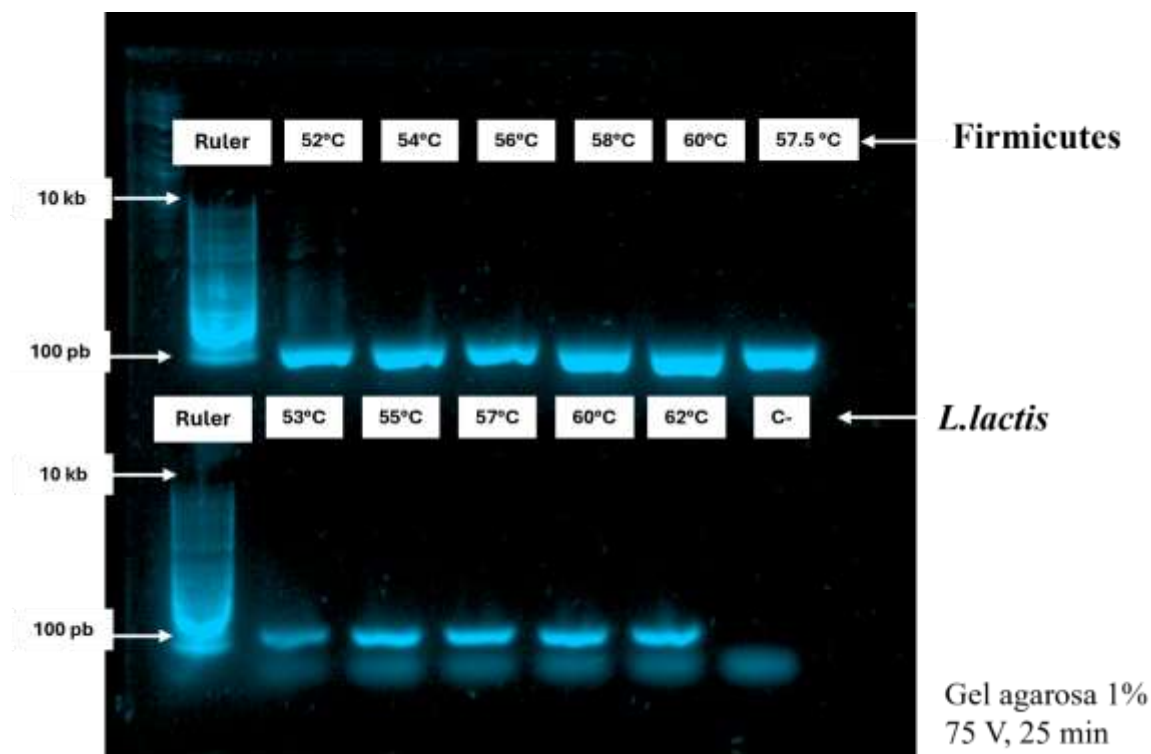


Figura 22. Gel de electroforesis para evaluar PCR de Firmicutes y *L. lactis*.

Adrián Ruiz Chávez:

### Estandarización de Primers para *Eubacterium Halli*

*Eubacterium halli* es considerado como un microbio importante en cuanto al balance metabólico intestinal debido a su habilidad para utilizar la glucosa y los intermediarios de la fermentación del acetato y lactato para formar butirato e hidrógeno. Este microorganismo es considerado como un probiótico debido al butirato que produce; puesto que tiene un papel importante en la homeóstasis energética, la motilidad del colon, inmunomodulación y en efectos de disminución inflamatoria intestinal. Adicionalmente es capaz de metabolizar glicerol a 3 hidroxipropionaldehído (3-HPA) el cual tiene propiedades antimicrobianas capaz de regular hasta cierto punto la microbiota intestinal (Mukherjee, A. *et al.* 2020).

Se llevó a cabo un primer Blast analizando los primers utilizados; Primer Forward (GCGTAGGTGGCAGTGCAA) y Primer Reverse (GCACCGRAGCCTATACGG) para llevar a cabo la PCR de *Eubacterium Halli* para un amplicón de 278 pb. Se encontró que estos pueden amplificar las cepas *E. Halli* ATCC27751, ya que los primers se alinean completamente a secuencias del mismo tamaño (278 pb). El primer Reverse es un primer degenerado, por lo que se podría suponer la amplificación de 2 bandas en la PCR, sin embargo, el programa Primer Blast mostró una alta especificidad para el ADN y la amplificación de este amplicón de 278 pb (Ye *et al.*, 2012). Además, al tener un único nucleótido degenerado (R pudiendo ser: A o G) la inespecificidad del primer a su fragmento de ADN podría no variar significativamente, de modo que se esperaría una única banda en el gel de electroforesis.

Cómo se muestra en la Figura 23, esto no es así; dos de los 5 pocillos amplificados presentan 2 bandas de ADN, cuyas temperaturas de amplificación son 54 y 58°C. Los pocillos de las temperaturas 56, 60 y 62°C presentaron una única banda (cómo era de esperarse) pero éstas estando a la par con el ruler de 100 pb, y con un degradado, pudiendo ser ocasionado por el voltaje de la electroforesis (demasiado alto). Finalmente, en la columna del control se observan los primers cuyo tamaño oscila entre los 15 y 20 pb. Al ser más chicos que el amplicón deberían estar por debajo de él y así es como sucede. Lo que se concluye es que los pocillos con 2 bandas amplificaron el fragmento de interés (278 pb) y a su vez otro fragmento

proveniente del primer degenerado de aproximadamente 100 pb. Los demás pocillos pudieron haber generado el amplicón de interés, pero es difícil determinarlo debido al barrido, así mismo se amplificaron otros fragmentos de ADN de secuencias más cortas (100 pb).

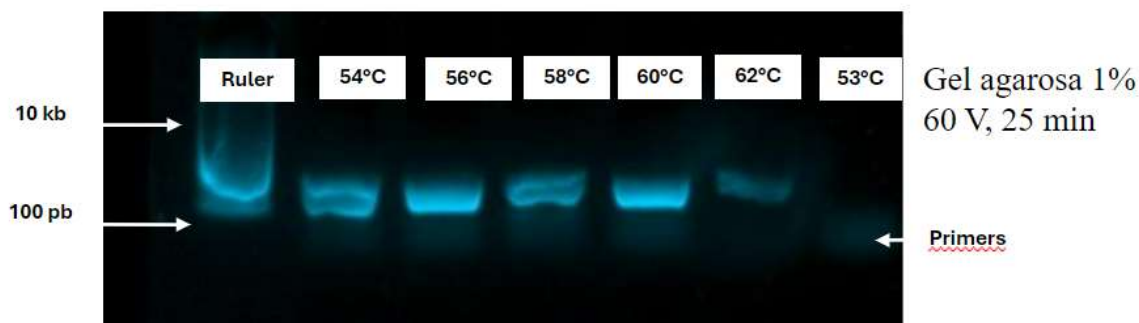


Figura 23. Gel de electroforesis de PCR en *E. Halli*.

Adrián Alberto Saldaña Mireles:

#### Estandarización de primers para *Clostridium coccoides*

*Clostridium coccoides* es un grupo de bacterias Gram positivas anaerobias del género *Blautia* que forma parte de la microbiota intestinal del ser humano; pueden formar esporas y tienen forma de coco, por eso el motivo de su nombre, aunque actualmente se les conocen como *Blautia coccoides*. Este grupo de bacterias es sensible a penicilina y rifampicina, pero resistente a kanamicina y colistina. Se ha observado que la actividad de estas bacterias en el intestino humano pueden afectarlo de diferentes maneras como lo es mediante la homeostasis del sistema inmune y en procesos patológicos. Entre las diferentes cosas que pueden provocar son la producción de ácidos biliares secundarios como el ácido desoxicólico y el ácido litocólico, además de que inducen la producción de células T, lo que hace de alguna manera regular el sistema inmune. Dentro de este grupo de bacterias se encuentran *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii*, *Eubacterium ramulus*, *Roseburia intestinalis*, *Clostridium scindens* y *Clostridium hylemonae* y *Anaerostipes caccae* (Kurakawa et al., 2018). Se llevó a cabo un primer Blast con los primers utilizados para realizar la PCR de *Clostridium*

*coccoides* para un amplicón de 200 pb y se observó que estos pueden amplificar las cepas antes mencionadas, teniendo un alineamiento completo en el primer forward (Ye et al., 2012).

En la Figura 24 se puede observar el gel de electroforesis de la PCR de *Clostridium coccoides*. Se puede ver que la temperatura en la que se observó mayor actividad (una banda más marcada) fue a 56°C, pero también existen bandas en las temperaturas de 54°C y 58°C, lo que puede indicar que ese puede ser un rango óptimo por el que se puede trabajar con ese primer. Igualmente, se pueden observar dímeros en la parte de debajo de las bandas, esto debido a la complementariedad. En el caso del control no se observa ninguna banda debido a que era poca la muestra que se introdujo en el gel. Las bandas se encuentran un cercanamente al marcador de 100 pb del ruler lo que indica el tamaño del amplicón de 200 pb.

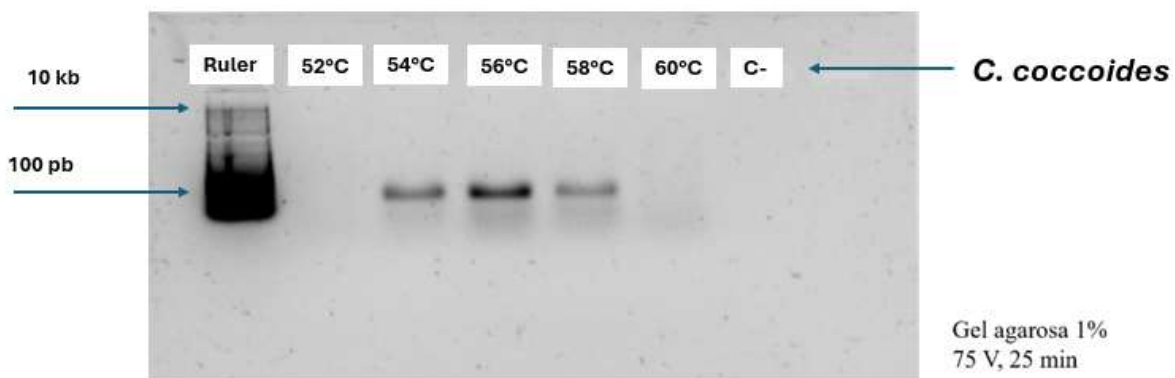


Figura 24. Gel de electroforesis para evaluar PCR de *C. coccoides*.

Diana Moreno:

#### Estandarización de primers para Bacteroidetes:

Bacteroidetes son un filo de bacterias gramnegativas que se encuentra en abundancia en el tracto gastrointestinal. La familia Bacteroidetes está compuesta por 3 clases de bacilos gramnegativo anaeróbicos, que pueden encontrarse en el suelo, agua del mar, intestino y piel de animales. La clase Bacteroidetes y sus géneros *Bacteroides* y *Prophyromonas* han sido los más estudiados debido a que se pueden encontrar en abundancia en las heces fecales y en la cavidad bucal (Flint y Duncan, 2014).

Dentro de la clase *Bacteroidetes* se encuentra el género *Bacteroides*, los cuales son bacilos gramnegativos anaeróbicos, con un genoma con gran cantidad de pares de base C-G. Esta clase constituye una parte importante de la microbiota intestinal. Son cruciales en el proceso de descomposición de polisacáridos complejos que llegan sin descomponer al colon (Ochoa, 2013)

En la Figura 25 se observa el gel de electroforesis de la PCR de *Bacteroidetes*. Se utilizaron cinco temperaturas dentro del rango 56°C a 64°C. En 62°C y 64°C no se observa actividad por un error al pipetear el ADN. Por lo tanto, solo se puede hacer el análisis con las temperaturas 56°C, 58°C y 60°C, de las cuales en esta última se puede observar mayor actividad, aunque de manera sutil. Esto indica que el rango de temperatura entre 56°C y 60°C es un rango óptimo para trabajar. En la última columna también se puede observar cómo hubo actividad aunque era el control de las muestras. Esto y el fallo con el pipeteo de ADN son puntos importantes a considerar para tener cuidado al momento de realizar la estandarización de los primers.

Se llevó a cabo un primer Blast analizando los primers utilizados para llevar a cabo la PCR de *Bacteroidetes* para un amplicón de 126 pb. De acuerdo con marcador o ruler que va de 100 pb a 10 kb se puede observar que las muestras cumplen con peso esperado según el primer Blast al estar al nivel de 100 pb (Ye *et al.*, 2012).

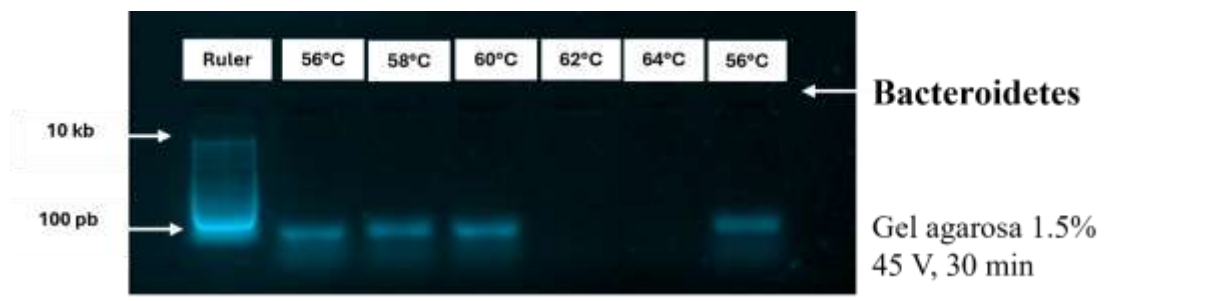


Figura 25. Gel de electroforesis para evaluar PCR de *Bacteroidetes*.

## 2.4 Ficha descriptiva de visita a ONI (Organismo de Nutrición Infantil)

**Organización:** Organismo de Nutrición infantil

**Fecha de la visita:** 10 de abril de 2024

**Participantes:**

- Algunos integrantes del equipo PAP
- Profesionales de ONI (nutrición, social, psicología, etc.)
- Doctoras encargadas del PAP

**Objetivo de la visita:** Presentación de proyecto “Microbiota intestinal de niños y niñas en situación vulnerable”

**Descripción de la visita:**

Durante la visita a ONI se llevó a cabo una presentación detallada del proyecto “Microbiota intestinal de niños y niñas en situación vulnerable”, impartida por 3 estudiantes que integran el equipo PAP, así como se aclararon dudas relacionadas a la información necesaria para poder realizar el estudio planteado en la presentación (apartado 1.8.3 de anexos generales).

**Contenido de la presentación:**

1. Marco teórico: se describe qué es la microbiota y un contexto de por qué es importante en las primeras etapas de vida de cualquier ser humano.
2. ¿Por qué ONI?: Descripción de por qué ONI es el Organismo ideal para trabajar con este proyecto.
3. Población de estudio: Se describen las edades de los NN que participaran en el estudio.
4. Objetivo General: Describe el objetivo de evaluar el estado nutricional de los NN con su ambiente y hábitos para poder relacionarlos con su microbiota intestinal.
5. Objetivos específicos: Describe un poco de lo que se quiere lograr con acciones específicas en el proyecto.
6. Metodología: Describe la metodología para tomar medidas antropométricas, evaluar la dieta y otros factores y la metodología molecular.
7. Cronograma de actividades: Describe las actividades que se tenían planeadas para el periodo de primavera 2024, verano 2024 y otoño 2024.
8. Perspectivas: Describe los planes que se tienen a futuro para el proyecto, como estrategias de intervención nutricional, estudios en otras poblaciones y análisis más robustos de la microbiota intestinal.

9. Sedes: Se muestran las sedes involucradas en el proyecto: ITESO, CUTLAJO y ONI.

### **Conclusiones y próximos pasos:**

Se generó un vínculo con los integrantes del equipo de ONI y se planificaron próximas visitas para dar a conocer a los tutores y padres de familia de NN el proyecto, así como se programaron fechas para recolección de datos y de muestras para el periodo de verano.

## 2.5 Ficha descriptiva de artículo de revisión sobre microbiota intestinal y su impacto en la salud infantil

**Tema:** Microbiota intestinal y su impacto en la salud infantil.

**Autores:** Todos los integrantes del equipo del PAP4D12A primavera 2024 incluyendo doctoras encargadas del PAP (algunos avances mostrados en apartado 1.8.8 de anexos generales).

**Resumen:** El artículo de revisión aborda la importancia del papel de la microbiota intestinal en el desarrollo y la salud de niños, centrándose en aspectos como su composición, función, la influencia de la dieta, los metabolitos microbianos que esta produce y la asociación de la microbiota con diversas patologías. Se proporciona un enfoque integral que cubre desde la formación inicial de la microbiota y su desarrollo en diferentes etapas de la vida, así como su relación con la salud de NN con un énfasis particular en el contexto sociodemográfico y nutricional de la población infantil mexicana.

### **Subtítulos del artículo:**

1. Microbiota intestinal: se define qué es la microbiota intestinal, la composición microbiana del intestino, sus funciones y las interacciones entre esta y el sistema inmune.
2. Metabolitos microbianos y su importancia: se habla los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), el metabolismo del triptófano y su papel en la salud intestinal y los antioxidantes producidos por la microbiota intestinal.
3. Desarrollo de la microbiota a lo largo de la vida: describe un poco sobre las cosas que influyen en la formación de la microbiota en prenatales, la evolución de la microbiota en recién nacidos y lactantes, y cambios en la microbiota durante etapas preescolar, escolar y adolescente.

4. Microbiota y dieta: explica las interacciones y efectos de la dieta en la microbiota, el papel de la fibra dietética en la salud intestinal, el impacto de los antioxidantes en la composición microbiana así como los efectos de los edulcorantes, aditivos y colorantes en esta.
5. Microbiota y metabolismo: se define el papel de las adipocinas en la regulación metabólica, explica las interacciones microbianas que afectan la producción de neurotransmisores y describe el eje intestino-cerebro y su relación con la microbiota intestinal.
6. Microbiota en patologías infantiles: explica la asociación entre microbiota y obesidad infantil, describe el impacto de la microbiota en el desarrollo de la diabetes tipo 1 y el autismo, así como el rol de la microbiota en enfermedades infecciosas y gastrointestinales inflamatorias.
7. Microbiota en niños mexicanos: genera un contexto sobre los factores sociodemográficos que influyen en la composición microbiana, el impacto de la dieta mexicana en la microbiota infantil así como las alteraciones que se presentan en esta asociadas a enfermedades metabólicas.
8. Probióticos: se describen los prebióticos, simbióticos, postbióticos y parabióticos y su potencial efecto en la salud intestinal.

## 2.6. Ficha descriptiva de visita a centro de atención de ONI para recabar datos

**Ubicación del centro de atención ONI:** Parroquia San Isidro Labrador Tlaquepaque

**Fecha de la visita:** 2 de mayo de 2024

**Objetivo de la visita:** Incorporación de NN en situación vulnerable al estudio de la microbiota intestinal y recopilación de datos y medidas antropométricas durante la entrega de sus Onifórmulas nutricionales.

### **Participantes:**

- Integrantes del equipo de investigación del proyecto de microbiota intestinal
- Estudiantes de primeros semestres de enfermería
- Personal de ONI
- Padres de familia o tutores de los NN participantes

### **Resumen de la visita:**

Durante la visita al centro de atención de ONI se llevó a cabo una jornada enfocada en reclutar NN beneficiarios de ONI para participar en el estudio de la microbiota intestinal durante la entrega de sus fórmulas nutricionales. Los aspectos más importantes de la visita se presentan a continuación:

1. Presentación del proyecto a padres de familia o tutores de los NN: Se dio a conocer a los encargados de los NN el objetivo y la importancia del estudio sobre la microbiota intestinal en sus NN, así como los beneficios de participar en el estudio.
2. Recolección de consentimientos informados: Se firmó un consentimiento informado por parte de los tutores o padres de familia que estuvieron de acuerdo en que sus NN participaran en el estudio. Además, se recopiló la información necesaria para contactar a los encargados de los NN para proporcionar información adicional relacionada al estudio y el historial contextual y dietético de los NN (apartado 1.8.5 de anexos generales).
3. Toma de medidas antropométricas: Se tomaron las medidas antropométricas: talla, peso, circunferencia de cintura, brazo, cuello y cabeza de los NN para obtener datos sobre su estado nutricional y crecimiento.
4. Instrucciones sobre la toma de muestra de heces: Se explicó a los padres de familia o tutores cómo recolectar muestras de heces de manera adecuada basándose en una infografía tomando en cuenta si los NN utilizaban pañal, o ya utilizaban el inodoro. Además, se repartieron kits con vaso para toma de muestra y abatelenguas, así mismo, se brindaron instrucciones sobre el almacenamiento de las muestras y se dieron recomendaciones para asegurar la calidad de estas (apartado 1.8.4 de anexos generales).

**Conclusiones y siguiente paso:** Se reclutaron los datos de 30 NN para comenzar a realizar llamadas y recabar la información completa de los participantes, así como la recolección de su muestra en su siguiente visita al centro de atención ONI. Se estableció una comunicación efectiva con los padres de familia y tutores, se obtuvo el consentimiento informado necesario y se proporcionaron las herramientas necesarias para la toma de muestra. Este paso estableció las bases para llevar a cabo un estudio integral que ayudará a mejorar la salud y bienestar de los NN de ONI.

## 2.7. Ficha descriptiva de carteles finales PAP

### **Participantes:**

- Estudiantes integrantes del PAP divididos en dos grupos
- Revisión por medio de las doctoras encargadas del PAP

### **Temas:**

- Documentación para estandarizar procedimientos del PAP 4D12 microbiota intestinal en niños y niñas en situación vulnerable.
- Estandarización de primers y extracción de ADN.

**Fecha de la exposición:** 9 de mayo del 2024.

**Conclusiones y perspectivas:** La elaboración de manuales es esencial para una correcta estandarización de los procedimientos que se van llevando a cabo para poder encontrar las condiciones y parámetros adecuados y obtener el mayor rendimiento. Estos manuales deben tener un sustento de documentos nacionales e internacionales tales como normas y acuerdos. Además, estos manuales serán la base para los estudiantes de los siguientes periodos que cursen el PAP. En la parte experimental se necesita realizar una segunda extracción de ADN para poder estandarizar ese procedimiento, debido a un error en la temperatura de incubación, lo que provocó una mala calidad de ADN extraído y por consecuencia puede afectar los procedimientos posteriores. Por otro lado, se observaron que las temperaturas ideales para correr PCR para Firmicutes y *Roseburia sp.* son de 60°C y 53°C, respectivamente. Se deben de tener en consideración todos los errores o problemas que se presentaron para que en base a ello se puedan estandarizar todos los pasos y de esta manera avanzar de una manera más eficaz y con buena organización.

## 3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

### 3.1 Sensibilización ante las realidades

Julieta: Participar en un proyecto de investigación con un enfoque tan específico me permitió como estudiante próxima a egresar ver la aplicación profesional con otra visión, ya que, tener un objetivo, una población y una metodología base para crear un proyecto tan grande como este me anima a seguir preparándome para servir a mi comunidad. Al principio me pareció un gran reto conocer y saber todo lo que se esperaba abarcar con el equipo PAP para el periodo de Otoño y las estandarizaciones requeridas para que en el siguiente periodo logren empezar a llenar las bases de datos. Sin embargo, cuando te comprometes y trabajas en equipo es más fácil y llevadero aprender y hacer las cosas bien. En particular, hace tiempo que llevé las materias donde aprendí las técnicas moleculares que utilizaríamos en el PAP, lo que requirió un buen comienzo para volver a repasar estos términos y poder cumplir de la mejor manera la identificación de los microorganismos que a mi me correspondían. Lo veo desde un punto personal, el considerar mi posición afortunada de estudiar esta carrera y saber que tener un base de datos completa de la taxonomía de microorganismos que la organización de ONI apoya ya mediante fórmulas podrá repercutir en el futuro para mejorar aún el perfil nutricional de estas poblaciones desfavorecidas.

De igual forma, pienso en la labor tan noble de las facilitadoras y representantes del PAP, que nos proporcionaron un escenario en donde de verdad se observa la utilidad de todos los proyectos de investigación que hicimos durante la carrera, ahora nos permitan realizar uno con aplicación tanto teórica como práctica para informar a la comunidad la utilidad de los posgrados en la vida diaria de otras realidades con las que conflúos.

Finalmente, cabe agregar que tener contacto directo con los participantes del estudio ayuda a que te sensibilices 100% con al manejo de información, muestras biológicas y tratamiento práctico en el laboratorio al ver cara a cara la postura fascinada de los padres de los NN al hacerse saber que este estudio es para mejorar la calidad alimentaria que ya reciben.

Diana:

Participar en este proyecto multidisciplinario en lo personal me resultó muy útil para conocer cómo, desde mi postura como estudiante de nutrición, puedo aportar a proyectos que busquen no solo generar conocimiento académico, sino también que eso tenga un impacto positivo en la población, sobre todo en aquellas personas en situación vulnerable, en este caso en NN

que son beneficiarios del Organismo de Nutrición Infantil (ONI). Tener un acercamiento a estos NN, así como a sus familiares o tutores, me permitió entender de forma más clara que nuestro proyecto tiene un propósito que va más allá de lo académico.

En México, actualmente nos enfrentamos con una problemática de desigualdad social que provoca afecta la nutrición de la población, entre ellos los infantes. Los organismos como ONI tienen un papel crucial para garantizar que, a pesar de esta situación multifactorial, los NN de México tengan la oportunidad de acceder a alimentos nutritivos y a educación nutricional que les permita desarrollarse y crecer de forma adecuada. Por eso, participar en este proyecto y con este organismo me da mucha satisfacción académica y personal.

Otra cosa importante fue encontrarnos con situaciones de niños, niñas y familiares o tutores, como que algunos solo podían ir en limitadas ocasiones a los centros de ONI, porque vivían en comunidades fuera de la ciudad. En algunos casos también nos comunicaron que algunos beneficiarios del organismo no sabían leer ni escribir. Lo cual tuvimos que tomar en cuenta al organizar el material didáctico o las mismas encuestas que aplicamos a los niños y niñas. Es diferente solamente leer acerca de los datos de analfabetismo, educación o de pobreza en México, a verlo directamente. Con esto aprendí que los proyectos no son adecuados si no están adaptados a las necesidades de todas las personas pueden beneficiarse del mismo.

Adrián R.:

Evidentemente la situación actual de nutrición de ciertas personas en la zona Metropolitana de Guadalajara y Jalisco es desfavorable. En general este proyecto se enfocó en NN en situación de desnutrición, en dónde ONI aporta cierta parte de donación en sus productos (fórmulas) para aportar las sustancias necesarias logrando una buena nutrición en estos NN. La importancia de involucrarse en este tipo de proyectos altruistas es generar información de valor demográfica para Jalisco y México. Conociendo información sobre la microbiota de estos niños, se podría informar a los padres cuál es el problema que pudiera estar relacionado con la dieta y cómo podría cambiar para mejorar la situación de los pequeños. Así mismo se podría compartir esta información con organizaciones públicas (ONI) y privadas (ITESO), de forma que ambas pudieran trabajar en conjunto con el gobierno para

desarrollar nuevas y mejores fórmulas o incluso formular distintos productos que sean parte de donaciones o financiadas por el gobierno y que mejoren la nutrición de estos nn en condiciones desfavorables.

Como propuesta para mejora de este PAP yo pondría a trabajar en conjunto ingenieros del iteso de las licenciaturas química y biotecnológica para el desarrollo de una nueva fórmula que sea más económica, más viable y sencilla de hacer y que provea un mismo o incluso un mayor valor nutricional. De esta forma se estaría avanzando no sólo en la información estadística sobre la microbiota de estos chicos sino también en cuanto a su nutrición y desarrollo acompañado a lo largo del proyecto. Finalmente, me gustaría mencionar que fue de mi agrado el involucrarme dentro de la vida de ciertos pequeños de la comunidad, sabiendo que la recolección, el análisis de muestras y de datos; es para su propio bien y el de las futuras generaciones. Sin más que decir puedo afirmar que la biotecnología y demás áreas de la ciencia pueden ser utilizadas para el bien común, para generar un cambio y ayudar a las personas que más lo necesitan.

Adrián S.: Conforme fue avanzando el proyecto se fue visibilizando más la ayuda que se estaba proporcionando a un sector de la sociedad que se encuentra en situación vulnerable pero visto desde una perspectiva diferente ya que la mayoría del trabajo se realiza en laboratorio y no se tiene un tiempo determinado de contacto con los padres de familia o tutores de NN del estudio. Además, el trabajo social se lleva a cabo mayoritariamente con el vínculo con ONI y con el vínculo que tiene la organización con las familias que acuden ahí. Algo muy importante a la hora de realizar una investigación en cualquier ámbito es tener un equipo multidisciplinario, ya que se tienen diferentes puntos de vista y se tiene un aprendizaje en áreas que no se dominan o no se tienen conocimiento alguno, siendo esto enriquecedor como alumno trabajando en un proyecto con enfoque social pero también donde se aplican todos los conocimientos que vas adquiriendo en tu licenciatura. Todo proyecto o investigación realizada debe tener un propósito, buscando siempre el mejoramiento de algún proceso, el resolver cualquier tipo de problema o ayudar a alguien que lo necesite. Siento que este PAP tiene un enfoque y propósito social muy concreto y que a pesar de que falta tiempo para tener resultados visibles para los beneficiados se van teniendo grandes avances para ser

el primer semestre que se imparte el proyecto. Con este proyecto puedo darme cuenta que la biotecnología puede ser de gran ayuda para la sociedad.

Elvira: Al principio del proyecto estaba preocupada por caer en la ignorancia de mi privilegio y no tomar en cuenta consideraciones que quizá podría no haber visto en el momento de la planeación para el contacto con ONI y para hablar con los padres de familia y tutores, por ejemplo, tomar en cuenta que algunos de los padres de familia y tutores podrían no saber leer. Pero conforme fue avanzando el proyecto y constantemente teníamos reuniones me fui sensibilizando y aprendiendo más del contexto de los beneficiarios de ONI.

Cuando recién conocí a ONI leyendo su página web me gustó mucho el enfoque del Organismo, pensé en todo lo que hay detrás, desde una increíble logística para poder tener personas trabajando ahí y toda la investigación y trabajo comunitario para el desarrollo de sus productos, además de la personalización con la cuentan dependiendo de las comunidades que están atendiendo. Me sentí muy entusiasmada por la idea de poder poner en práctica conocimiento de mi carrera que creí sería difícil aplicar en México en un estudio que podría cambiar la vida de muchas personas para bien una vez obteniendo los resultados.

Durante la primer visita a ONI fue muy interesante conocer el proceso de los padres de familia y tutores de los NN, cómo llegan al Organismo y van aprendiendo poco a poco y se quedan y se vuelven consistentes porque notan cambios positivos en sus NN. Creo que la divulgación de ciencia, en este caso información de nutrición básica para tener una mejor calidad de vida debe estar al alcance de todos, porque toda la información que se genera es para un bien común. Me motivó mucho que el encargado del área de nutrición comentara cómo alguna vez le tocó que la mamá de uno de los niños comenzara a explicarle cómo armar una mejor dieta y el por qué de algunas cosas que ONI le recomendaba.

Creo que todo lo que se hará en este estudio debe ser divulgado para llegar a la mayor cantidad de personas posible porque es muy importante considerar cómo los factores socioeconómicos y culturales influyen en la microbiota intestinal y, a su vez, en la salud de los NN. Todas las publicaciones que se generen a raíz de los resultados obtenidos en este estudio podría ayudar a resaltar disparidades y ayudar a abogar por políticas y programas que promuevan la equidad en salud para todos los NN mexicanos, independientemente de su origen socioeconómico, porque son el futuro de nuestro país.

### 3.2 Aprendizajes logrados

Julieta: Los aprendizajes que más considero relevantes en cuanto a las competencias disciplinares que tiene un estudiante con formación en ingeniería en biotecnología es la facilidad de multidisciplinariedad que tiene el programa de la carrera que te permite aprender rápido de los temas de nutrición que no teníamos tanto dominio, así como sentirnos seguros al trabajar con material genético y reforzar lo aprendido en las materias de ciencias biológicas básicas y ciencias biológicas aplicadas respecto a las PCR de punto final y su valoración por electroforesis en geles de agarosa. De forma social, logramos emparejar nuestra comunicación con otros profesionistas de diferentes ramas, como lo fueron nutricionistas, psicólogos y recursos humanos, los cuales son imprescindibles para llevar a cabo proyectos de aplicación social tan específica y crear organizaciones como lo es ONI. Las bases universitarias que ITESO nos inculca durante nuestra formación fueron muy útiles a la hora de observar los retos bioéticos del proyecto, ya que es un trabajo con seres humanos y es importante valorar su consentimiento aprobatorio o desaprobatorio de proyectos de investigación. También valorar el conocimiento de los contextos de históricos y culturales en los que se encontraba la población de estudio que nos permitió informar de forma más sencilla el propósito del estudio y como ellos nos ayudarían desde la toma de muestra hasta los cuestionarios de antecedentes de los NN y familiares.

Fue muy satisfactorio profesionalmente saber que seríamos parte del inicio de esta investigación de microbiota intestinal en niños de situación desfavorecida de comunidades alejadas de la ZMG y que esto quedaría como evidencia en un artículo de publicación que seguramente va a servir como pauta para otros investigadores. Así mismo, al ser una persona muy activa y con afán de apoyar en cuanto sea mis posibilidades se que este tipo de concientización científica es imperativo para las comunidades en situación de escasos recursos en un país como México, ya que, al ir haciendo evidente la especialización de la microbiota infantil podremos tener NN con mejor calidad de vida, y lograr que otros sectores de la nación como economía, salud, educación, comercio, por poner algunos ejemplos, puedan tener más variedad que ofrecer a estos sectores de la población, en base a sus necesidades. Personalmente, creo que la microbiota intestinal si juega un papel importante en nuestro según cerebro, ya que muchas reacciones que gestiona nuestro sistema nervioso

repercuten en la estabilidad de está. Si tu microbiota tiene un desbalance las reacciones metabólicas se desequilibran ocasionando inflamación en nuestros organismos principalmente, y es incómodo vivir o sobrevivir así. Así que apuesto siempre por el estudio de la microbiota y su relación con un buen estado de salud.

Diana:

A lo largo de este proyecto he tenido distintos aprendizajes nuevos, algunos enfocados en nutrición y otros relacionados con temas de biotecnología que, aunque vi poco de eso en mi carrera, reconozco su importancia para realizar investigación de nutrición sobre todo si es enfocada a microbiota intestinal. Sobre la microbiota tuve aprendizajes metabólicos, pero también conocí mejor los microorganismos que la componen y cómo podemos identificar si están presentes en el tracto digestivo. Dentro del laboratorio tuve la oportunidad de llevar a cabo distintos procedimientos como la estandarización de primers con la ayuda de extracción de ADN y realizando electroforesis. Los manuales que realizaron mis compañeros fueron de utilidad para conocer cómo realizar estos procedimientos.

Además, leer y trabajar mucho con artículos científicos me permitió aplicar un pensamiento crítico para comprender cómo se debe redactar un artículo y saber filtrar entre la información que vaya encontrando. Fue muy útil tener la oportunidad de participar en la redacción de un artículo de revisión, debido a que la búsqueda de información sobre la microbiota intestinal en niños y niñas mexicanos me ayudó a comprender más la importancia de una microbiota saludable para la salud de las personas y como nuestra dieta afecta directamente su composición.

También realizar material didáctico y de divulgación científica como las presentaciones y los carteles que presentamos en el CIAM fueron de importancia para aprender a sintetizar mis ideas y las de mi equipo. Sobre todo, fue importante para comprender que al realizar este tipo de productos debemos asegurarnos de que sea fácil de comprender para los demás, aunque no sean expertos en los temas que abordamos.

Por último, otro aprendizaje importante fue comprender la complejidad del contexto de distintas personas en México. Durante este proyecto observamos cómo la compleja situación que pueden atravesar algunas familias puede afectar su dieta y por lo tanto su salud. Es

importante crear proyectos que no solo generen información, sino que permitan identificar formas de mejorar la situación actual que viven muchas personas en el país.

Adrián R.:

A lo largo de este proyecto podría decir que se logró aprender a estandarizar un procedimiento o protocolo a seguir para lograr reproducir y obtener los resultados de la PCR. Así mismo, se logró aprender cómo es que funcionan y cómo manipular distintos equipos de laboratorio que me van a ayudar a obtener los productos de una PCR. Adicionalmente, puedo asegurar que se logró interpretar de forma correcta la divulgación de distintos artículos científicos para poder redactar nuestro propio review. Se aprendió a seleccionar temas relacionados al proyecto y que pudieran justificar los resultados obtenidos, así como el análisis e interpretación de gráficos y datos estadísticos de este rubro. Este review me permitió organizarme y ponerme de acuerdo con los integrantes y de esta forma aprender a trabajar en equipo. Además, logré identificar las consideraciones bioéticas que tienen que ser tomadas en cuentas a nivel nacional e internacional cuando se hacen experimentos o trabajos que tienen como objeto de estudio al ser humano. Finalmente, me gustaría agregar que aprendí a tratar todos estos residuos y desechos biológicos de manera correcta de tal forma que no se ponga en peligro la seguridad de quien trabaja con ellos ni la seguridad bioética de la sociedad o de quienes proporcionan estas muestras. De manera general podría decir que aprendí a identificar la organización, estrategia y planeación así como trabajos a futuro que se deben de considerar en proyectos en general y sobre todo en proyectos que utilizan pruebas en humanos.

Adrián S.: Durante la elaboración de este proyecto pude emplear la mayoría de los conocimientos adquiridos en otras materias en cuestión de laboratorio y redacción de la divulgación científica. Igualmente, pude desarrollarme en cuestión de trabajo en equipo y organización de tiempos. En el desarrollo del PAP en el laboratorio se vuelve un poco más independiente y eso genera un pensamiento crítico y confianza en los estudiantes, al igual que le proporciona a los alumnos un espacio en el que pueden aprender de otras áreas y de otros puntos de vista. Fue de mi agrado que el proyecto se llevara a cabo en aula y laboratorio, ya que al ser un proyecto de investigación es muy necesario informarse sobre el tema y fue

de gran ayuda la realización del artículo de revisión. El trabajar con personas de otras carreras favoreció el desarrollo del proyecto, ya que al ser un grupo multidisciplinario se tienen diferentes puntos de vista sobre una problemática en específico y así se pueden obtener alternativas y soluciones variadas.

Logré aprender de este proyecto el trabajar con material biológico infeccioso y cómo es que se debe de llevar un protocolo sustentado con normas para que no resulten problemáticas o accidentes; igualmente, aprendí a redactar un artículo de revisión basándose en una búsqueda basta en cuestión del tema de interés. En el ámbito social el PAP tiene un gran propósito con NN en situación vulnerable y es por esto por lo que se tiene una motivación al realizar todas las actividades planeadas, así que como aprendizaje está que de una idea o proyecto siempre puedes ayudar a alguien que lo necesite. En lo personal me llevó el aprendizaje y la experiencia de trabajar con muestras biológicas, el aprender de otros puntos de vista, el reforzar aprendizaje de toda la carrera y que el trabajo en equipo es básico para poder llevar a cabo una investigación completa y enriquecedora. Es por estas razones que continuaré en el PAP el periodo que viene.

Elvira: Durante el desarrollo de este proyecto logré mejorar mi capacidad de búsqueda y análisis de artículos científicos, además de aprender un poco sobre cómo funcionan algunos análisis estadísticos, parte importante de cualquier artículo y que es fundamental comprender para poder analizar correctamente los resultados y discusiones obtenidos por cualquier artículo. Creo que la parte estadística es la que aún me cuesta trabajo y me gustaría seguir aprendiendo. Así mismo, aprendí mucho sobre la microbiota intestinal, su composición y cómo influye en la vida de las personas desde el nacimiento. Además, aprendí sobre las consideraciones que se deben tomar cuando se trabaja con muestras biológicas infecciosas y recordar que siempre se deben usar guantes al tocar el material de laboratorio fue muy importante. Repasé temas de genética y logré llevar a cabo la PCR y gel de electroforesis de mis dos microorganismos. Anteriormente me daba miedo utilizar los equipos, programarlos e incluso me daba miedo preparar las muestras para correr el gel, creo que logré sentirme un poco más segura de hacerlo la segunda vez que corrí una PCR a pesar de no haber obtenido mejores resultados que la primera vez.

Me sentí abrumada de hacer el manual de estandarización de primers porque no recordaba muy bien cómo funcionaban y tampoco sabía cómo se hacía una estandarización, sin embargo, hice una extensa investigación para recordar cómo diseñar el termograma para una PCR y esto me permitió tener más claro el procedimiento, así como los fundamentos básicos de una PCR y la estandarización de los primers. De igual forma durante la extracción de ADN fui capaz de comprender los principios básicos del proceso, los cuales fueron: la lisis de muestras de heces con el buffer ASL, la adsorción de impurezas que podrían dañar el ADN o inhibidores de PCR por medio de la matriz InhibitEX, y la purificación de la muestra de ADN por medio de las columnas y centrifugación. Como perspectiva para los siguientes periodos se recomienda volver a realizar la extracción de ADN tratando de homogeneizar la muestra lo mejor posible en cada vortexeo, así como seguir la indicación de incubar a 95°C cada vez que sea necesario, sobre todo en la primera incubación para romper las membranas de todos los microorganismos. Aprendí a realizar algunas medidas antropométricas y un poco sobre nutrición gracias al equipo multidisciplinario, lo cual facilitó mi comprensión en muchas de las investigaciones realizadas.

Finalmente, logré desarrollar un poco más mis habilidades sociales, no me considero buena presentando o hablando con las personas y decidí lanzarme a presentar siempre que pudiera para quitarme el miedo y los nervios y agarrar más experiencia, y creo que me siento más segura de mí misma en ese aspecto. Cuando se realizó la presentación voluntaria para el CIAM hubo un momento en que desee que no eligieran el cartel de mi equipo porque me daba miedo, pero simplemente tenía que prepararme y hacerme lo más experta posible en el tema dentro de mis posibilidades y al final todo salió bien. Así mismo, durante la visita en el centro de atención de ONI, estaba nerviosa por hablar con los padres de familia y tutores de NN, y también salió bien. Este es uno de los logros que más aprecio y puedo rescatar de este proyecto ya que a veces puedo ser bastante tímida.