

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Evaluación de Marcadores de Inflamación y Sistemas Antioxidantes
en Saliva de Lactantes, Leche Materna y Fórmula Infantil

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Nutrición Clínica Integral

Presenta

LN. Berenice Méndez Rojas

Dirigido por:

Dra. Karina de la Torre Carbot

Santiago de Querétaro, Querétaro

17 de mayo del 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Clínica Integral

Evaluación de Marcadores de Inflamación y Sistemas Antioxidantes en Saliva de Lactantes, Leche Materna y Fórmula Infantil

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Nutrición Clínica Integral

Presenta:

LN. Berenice Méndez Rojas

Dirigido por:

Dra. Karina de la Torre Carbot

SINODALES

Dra. Karina de la Torre Carbot
Presidente

Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez
Secretario

Firma

Dr. Juan Carlos Solís Sáinz
Vocal

Firma

Dr. Jorge Luis Chávez Servín
Sinodal

Firma

Dr. Pablo García Solís
Sinodal

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
17 de diciembre del 2020
México

DEDICATORIAS

A mi mamá, a quien agradezco su apoyo constante, la confianza y la libertad de dejarme vivir mis propias experiencias y aprender de ellas; por darme la oportunidad de seguir persiguiendo mis sueños. Gracias ma, por tu ejemplo de fortaleza, por tu carácter que de alguna forma ha forjado también el mío, por tu bondad y tu sensibilidad, por ser esa mujer tan trabajadora, valiente, independiente, inteligente y atrevida. Este también es tu logro, eres la mejor, te adoro.

A mi abuelito Francisco, a quien quiero con todo mi corazón y quien ha llegado a ser como un papá en mi vida. Gracias por todos esos momentos compartidos que valen oro, que atesoro con toda mi alma y que son siempre tan nutritivos; por tus enseñanzas, tu gran visión de la vida, tu sabiduría y tu calidad como ser humano; por consentirme y amarme tanto y, a su vez, ayudarme a mantener los pies sobre la tierra. Agradezco tu apoyo, tus palabras de aliento que han hecho de mi una mejor mujer. Gracias por creer en mí, te admiro y te llevo siempre presente.

A mis amigas Claudia, Michelle, Mariana, Paloma y Sandy, por acompañarme durante esta aventura llamada vida, llena de momentos alegres y tormentosos, gracias por formar parte esencial de mi existir, por sus consejos, sus palabras de aliento y también por aquellas ocasiones en las que han tenido que darme un pequeño jalón de orejas. Gracias porque a pesar de los años y la distancia, seguimos unidas y continúan siendo un gran pilar en mi día a día. Soy afortunada de tener amigas tan valiosas y exitosas en cada una de sus ramas. Las quiero muchísimo.

A mi abuelita Victoria y a mi tía Karina, por su apoyo incondicional, por estar pendiente de mis logros, por su amor, su cariño y su gran corazón, las quiero mucho.

A quienes hoy ya no están aquí, especialmente a Paco y a mi abuelito Chava, porque ocupan un lugar muy especial en mi corazón.

A mi novio Josué, por su paciencia y comprensión, por ser un refugio en los momentos más difíciles, por sus consejos y sus palabras de ánimo; por esa actitud tan positiva, calmada y llena de energía; por hacerme sentir amada, querida y respetada. Gracias por tanto y tanto amor, por ser ese compañero que creí no existía más y en ti lo he encontrado. Te amo pequi.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Karina y a mis sinodales la Dra. Minerva, el Dr. Pablo, el Dr. Jorge y el Dr. Juan Carlos, por impulsarme y retarme para encontrar soluciones y dar siempre lo mejor de mí; por su tiempo y apoyo, gracias infinitas.

A la Dra. Tere, por ser una gran profesora, una excelente mujer y gran investigadora. Por su calidad humana y su actitud de servicio hacia la sociedad; por compartir y contagiar su amor a la ciencia, por ser un gran ejemplo en toda la extensión de la palabra.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, en especial a la Facultad de Ciencias Naturales, la Facultad de Química y la Facultad de Medicina.

A la Secretaría de Salud del Estado de Querétaro, especialmente al centro de Salud Satélite y a su personal en general, por su amabilidad y apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyt) por la confianza y la beca brindada durante la maestría.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1 Especies reactivas de oxígeno.....	3
2.2 Inflamación y especies reactivas de oxígeno.....	4
2.3 Sistemas antioxidantes.....	5
2.4 Leche materna. Composición y beneficios	8
2.5 Sistema inmunológico en lactantes	13
2.6 Estrés oxidativo en lactantes	16
2.7 La saliva como medio para el análisis	20
2.8 Antecedentes.....	21
III. JUSTIFICACIÓN	30
IV. HIPÓTESIS	31
V. OBJETIVOS.....	32
5.1 Objetivo general	32
5.2 Objetivos específicos.....	32
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1 Diseño del estudio.....	33
6.2 Definición del universo	33
6.3 Tamaño de la muestra.....	33
6.4 Criterios de selección	34
6.4.1 Criterios de inclusión	34
6.4.2 Criterios de exclusión.....	34
6.4.3 Criterios de eliminación.....	35
6.5 Procedimiento de recolección de la información.....	35
6.5.1 Reclutamiento	35
6.5.2 Aplicación de encuestas generales.....	35
6.5.3 Toma de medidas antropométricas del lactante.....	36
6.5.4 Obtención de muestras de saliva	36
6.5.5 Obtención de muestras de leche	37
6.6 Prueba piloto	38
6.7 Variables	38
6.8 Determinaciones de laboratorio	39
6.8.1 Cuantificación de proteína.	40
6.8.2 Determinación de sistemas antioxidantes	42

6.8.2.1 Catalasa.....	42
6.8.2.2 Glutación reducido.....	44
6.8.2.3 Glutación peroxidasa	47
6.8.3 Determinación de citocinas proinflamatorias	50
6.8.3.1 TNF- α Humano.....	50
6.8.3.2 IL-1 β humano.....	55
6.8.4 Pruebas de capacidad antioxidante.....	55
6.8.4.1 FRAP	55
6.8.4.2 DPPH	58
6.9 Lineamientos éticos	60
6.10 Análisis estadístico	60
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
7.2 Análisis en saliva de lactantes	63
7.2.1 Sistemas antioxidantes	63
7.2.2 Marcadores de inflamación	67
7.2.3 Capacidad antioxidante	70
7.3 Análisis en leche	73
7.3.1 Sistemas antioxidantes y marcadores de inflamación.....	73
7.3.2 Capacidad antioxidante.....	78
VIII. CONCLUSIÓN	81
IX. REFERENCIAS.....	82
X. ANEXOS.....	93
ANEXO A. CONSENTIMIENTO INFORMADO	94
ANEXO B. CUESTIONARIO DE SELECCIÓN	97
ANEXO C. CUESTIONARIO DEL LACTANTE.....	100
ANEXO E. ESTÁNDARES Y CURVAS DE CALIBRACIÓN	104
ANEXO F. ECUACIONES LINEALES	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reducción del H ₂ O ₂ llevada a cabo por la CAT.	6
Figura 2. Reducción de H ₂ O ₂ por medio de la enzima GPx.....	6
Figura 3. Síntesis de GSH.	8
Figura 4. Reciclaje enzimático de GSH.	44
Figura 5. Sistemas antioxidantes medidos en saliva de lactantes.....	64
Figura 6. Sistemas antioxidantes en saliva de lactantes (grupo piloto).	66
Figura 7. Marcadores de inflamación medidos en saliva.....	67
Figura 8. Concentración de marcadores de inflamación en saliva conforme al tipo de lactancia (grupo piloto).	69
Figura 9. Pruebas de capacidad antioxidante en saliva de lactantes..	70
Figura 10. Pruebas de capacidad antioxidante total en saliva de lactantes (grupo piloto).	71
Figura 11. Capacidad antioxidante total en LM y FI.	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales de la población de estudio.	62
Tabla 2. Sistemas antioxidantes, marcadores de inflamación y capacidad antioxidante en saliva con relación al tipo de alimentación.	72
Tabla 3. Sistemas antioxidantes, marcadores de inflamación y capacidad antioxidante en saliva con relación al tipo de alimentación.	73
Tabla 4. Sistemas antioxidantes, marcadores de inflamación y capacidad antioxidante en LM.	74
Tabla 5. Porcentaje de inhibición en LM y FI.	78
Tabla 6. Correlación de variables entre los grupos de LM y FI + mixta.	79
Tabla 7. Preparación de estándares de albúmina.	104
Tabla 8. Curva estándar de GSH.	104
Tabla 9. Preparación de estándares para TNF- α	104
Tabla 10. Curva de calibración FRAP.	105
Tabla 11. Curva de calibración DPPH.	105

Dirección General de Bibliotecas UAQ

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: albúmina sérica bovina
CAT: catalasa
DPPH: radical 2-2-difenil-1-picrilhidrazil
EO: estrés oxidativo
ERN: especies reactivas de nitrógeno
ERO: especies reactivas de oxígeno
ET: equivalentes de trolox
FeCl₃·6H₂O: cloruro de hierro hexahidratado
FI: fórmula infantil
FRAP: poder antioxidante reductor del hierro
GPx: glutatión peroxidasa
GR: glutatión reductasa
GSH: glutatión reducido
GSSG: glutatión oxidado
HOCL: ácido hipocloroso
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
IEO: índice de estrés oxidativo
Ig: inmunoglobulina
IgAs: Inmunoglobulina A secretora
IL: interleucina
IMC: índice de masa corporal
LM: leche materna
LME: lactancia materna exclusiva
MDA: malondialdehido
Na₂HPO₄: fosfato de sodio dibásico
NaH₂PO₄: fosfato monosódico
NLRP3: proteína receptora NOD3
ORAC: capacidad de absorción de radicales oxígeno
P/E: peso para la edad

P/T: peso para la talla

PC/E: perímetro cefálico para la edad

RL: radical libre

SDG: semanas de gestación

SI: sistema inmunológico

SMB: solución blanco

SOD: superóxido dismutasa

T/E: talla para la edad

TCA: ácido tricloroacético

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TPTZ: 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina

Dirección General de Bibliotecas UAQ

RESUMEN

Introducción: La leche humana es un fluido complejo y dinámico cuya función va más allá de nutrir. Además de tener propiedades antimicrobianas, su composición rica en compuestos bioactivos provee de protección al lactante contra factores oxidantes e inflamatorios. En este contexto los lactantes alimentados con fórmulas infantiles (FI), se encuentran en desventaja, quedando vulnerables a ciertas amenazas, incluyendo una mayor susceptibilidad a la inflamación y estrés oxidativo. Existen algunos marcadores que pueden evaluarse por medio de muestras de saliva que permiten de forma poco invasiva conocer el comportamiento de sistemas antioxidantes y marcadores de inflamación.

Objetivo: Evaluar marcadores de inflamación y sistemas antioxidantes en saliva de lactantes y leche materna.

Materiales y métodos: Se obtuvieron muestras de saliva de lactantes alimentados con leche materna (LM) de forma exclusiva (n=20) y FI + lactancia mixta (n=8). También se recolectaron muestras de LM (n=20) y FI (n=8). Se midió en saliva y LM la concentración [glutación reducido (GSH)] y actividad [glutación peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT)] de sistemas antioxidantes y marcadores de inflamación [interleucina 1 beta (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)]. La capacidad antioxidante se midió en saliva, LM y FI por medio de los ensayos DPPH y FRAP.

Resultados: Se encontró mayor concentración de GSH (p=0.002), actividad aumentada de GPx (p=0.005), así como concentración aumentada de IL-1 β (p=0.049) y TNF- α (p=0.002) en saliva de lactantes del grupo FI + lactancia mixta. No se encontraron diferencias entre la capacidad antioxidante de la LM y FI.

Conclusión: Los niveles elevados de sistemas antioxidantes y marcadores de inflamación en saliva de lactantes que reciben FI, ya sea de manera exclusiva o mixta, parecen estar relacionados con una respuesta compensatoria del organismo ante un posible incremento de especies reactivas de oxígeno.

ABSTRACT

Introduction: Human milk is a complex and dynamic fluid whose function goes beyond nourishing. In addition to having antimicrobial properties, its composition, rich in bioactive compounds, provides protection to the infant against oxidizing and inflammatory factors. In this context, infants fed with infant formula are at a disadvantage, being vulnerable to certain threats, including increased susceptibility to inflammation and oxidative stress. There are some markers that can be evaluated by saliva samples that allow a non-invasive way to know the behavior of antioxidant systems and markers of inflammation.

Aim: To evaluate inflammation markers and antioxidant systems in infant saliva and breast milk.

Methods: Saliva samples were obtained from infants fed with breast milk exclusively (n=20) and infant formula + mixed breastfeeding (n=8). Breast milk (n=20) and infant formula (n=8) samples were also collected. The concentration (GSH) and activity (GPx and CAT) of antioxidant systems and inflammation markers (IL-1 β and TNF- α) were measured in saliva and breast milk samples. Antioxidant capacity was measured in saliva, breast milk and infant formula by DPPH and FRAP assays.

Results: There were notable differences in the antioxidant parameters evaluated in saliva between breast milk group and formula milk + mixed breastfeeding group, particularly concerning the levels of GSH (p=0.002), GPx activity (p=0.005), IL-1 β (p=0.049) and TNF- α (p=0.002), these parameters were higher in formula milk + mixed breastfeeding group. No difference was found in the mean total antioxidant capacity of the saliva between breast milk and formula + mixed breastfeeding groups.

Conclusion: The elevated levels of antioxidant systems and markers of inflammation in saliva of infants receiving formula milk, either exclusively or mixed, appear to be related to a compensatory response of the organism to a possible increase of ROS.

I. INTRODUCCIÓN

La leche humana es un fluido complejo y dinámico secretado por la glándula mamaria, provee nutrición y protección para el desarrollo del lactante. Se digiere con facilidad, es altamente accesible y de bajo costo. Contiene una gran cantidad de factores bioactivos, muchos de los cuales provienen de la misma glándula mamaria y de las células inmunitarias presentes en la leche materna (LM). Estos factores bioactivos producen una cascada de efectos que contribuyen a la orquestación y especialización del sistema inmunológico (SI) del lactante (Ustundag et al., 2005; Castellote et al., 2011; Hassiotou & Geddes, 2015; Matos et al., 2015; de la Torre & Chávez-Servín, 2017; Dawod et al., 2019).

Dado que el periodo postparto marca una ventana de oportunidad para el desarrollo del bebé; en el cual los factores dietéticos y ambientales tendrán un gran impacto en su salud durante el resto de su vida, el tipo de alimentación recibida durante esta etapa de vida cumple un papel importante (Gregory & Walker, 2013; Dawod et al., 2019).

La susceptibilidad de los lactantes a las enfermedades infecciosas es una consecuencia directa de la difícil adaptación inmunológica durante el periodo de transición del ambiente intrauterino al extrauterino. La ontogenia del SI comienza desde el embrión y se completa hasta años después del nacimiento (Chirico et al., 2008; Gregory & Walker, 2013).

La LM además de nutrir, mantiene el vínculo inmunológico materno-fetal y favorece la transmisión de la inmunocompetencia de la madre al bebé, otorgando defensa de forma directa al lactante durante uno de los periodos más delicados y a su vez contribuyendo de forma crucial a la especialización inmunológica de éste. La LM se ha considerado como la primer vacuna del lactante que brinda inmunidad pasiva (Schack-Nielsen et al., 2007; Chirico et al., 2008; Garofalo, 2010; García-López, 2011; Andreas et al., 2016).

Las citocinas son uno de los factores bioactivos más importantes de la LM, ya que son requeridas para proteger al lactante contra infecciones y participan en la

estimulación activa de su SI. También participan en el desarrollo de órganos y favorecen una colonización microbiana saludable. El aporte de citocinas por medio de la LM es de importancia, ya que la producción de estas proteínas en lactantes es baja. Las citocinas aportadas por la leche comprenden: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL): IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-8 (Ustundag et al., 2005; Penton-Rol et al., 2009; Gregory & Walker, 2013; Brenmoehl et al., 2018; Gila-Diaz et al., 2019;).

La leche humana también es fuente de sistemas de defensa antioxidante, entre los que se encuentran el GSH, las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). También cuenta con antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas A, E y C, coenzima Q y melatonina, entre otras (Tijerina-Sáenz et al., 2009; Xavier et al., 2011; Illnait-Ferrer, 2012; Arana et al., 2017). Estos antioxidantes representan protección al lactante frente a los radicales libres (RL), principalmente a nivel respiratorio y gastrointestinal, y disminuyen el riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con RL (Shoji et al., 2003; Yao et al., 2010; Gitto et al., 2012; Sandal et al., 2013; Mutinati et al., 2014).

La monitorización cercana de agentes de inflamación y sistemas antioxidantes en lactantes puede llevarse a cabo mediante técnicas no invasivas como es el análisis por medio de saliva. El muestreo de ese fluido se caracteriza por ser un procedimiento no invasivo, de fácil recolección, bajo costo y sin generación de estrés para el lactante. Además, la saliva presenta una vida útil relativamente larga en comparación con la sangre, lo que lo hace un proceso más seguro y factible, principalmente en población infantil (Greabu et al., 2009; Pei Wen et al., 2016; Maciejczyk et al., 2018).

En el presente trabajo se estudiaron los sistemas antioxidantes, marcadores de inflamación y capacidad antioxidante en la saliva de los lactantes, con base al tipo de lactancia recibida. También se realizó el análisis de los marcadores anteriormente mencionados en LM y la determinación de capacidad antioxidante en FI.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres (RL) son moléculas altamente reactivas con uno o más electrones no apareados, por lo tanto, donan o ganan electrones de otras moléculas en un intento por aparear sus electrones y generar especies químicamente más estables. Los RL son producidos normalmente en organismos vivos y se dividen en especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) (De Gálvez, 2010; Mutinati et al., 2014; Aceti et al., 2018), juegan un papel importante en los mecanismos de defensa y en la destrucción de células dañadas. Pueden actuar como mensajeros intracelulares y extracelulares y contribuir a la homeostasis, también favorecen el tono vascular (Matos et al., 2015; Gyurászová et al., 2018). Las ERO y las ERN incluyen tanto RL como moléculas que no son RL. Entre los RL provenientes de las ERO se incluye: el radical hidroxilo, superóxido y peróxilo. El peróxido de hidrógeno, ozono, oxígeno, ácido hipocloroso y peróxidos orgánicos forman parte de las ERO que no son RL. De igual forma, para las ERN el óxido nítrico y el dióxido de nitrógeno son RL; mientras que, el ácido nitroso y el trióxido de dinitrógeno no lo son (Ozsürekci & Aykac, 2016; Aceti, et al., 2018).

Cuando los RL se producen en exceso desencadenan efectos perjudiciales en el organismo, es aquí cuando los sistemas antioxidantes endógenos como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y el cofactor glutatión reducido (GSH), bilirrubina, ácido úrico, melatonina y exógenos como los flavonoides, las vitamina E y C, ayudan a mantener el equilibrio mediante la neutralización de ERO, lo cual se logra apareando sus electrones logrando de esta forma convertirlos en moléculas químicamente estables (De Gálvez, 2010; Aceti, et al., 2018; Gyurászová et al., 2018).

El desequilibrio entre el exceso en la producción de ERO y su eliminación por medio de los antioxidantes, conduce al estrés oxidativo (EO), llegando a ocasionar lesión tisular y celular, peroxidación lipídica en los lípidos de las membranas celulares, lo cual ocasiona la destrucción de las mismas, alteraciones en la función

y estructura de proteínas y daño al ADN (De Gálvez, 2010; Aceti et al., 2018; Gyurászová et al., 2018).

2.2 Inflamación y especies reactivas de oxígeno

La inflamación aguda es parte de la respuesta inmunitaria natural del cuerpo, es esencial para una apropiada respuesta inmunológica y para proteger al cuerpo contra agentes infecciosos, por lo que el estímulo inflamatorio cumple funciones de defensa del organismo. Sin embargo, el exceso de inflamación o inflamación crónica puede llegar a ocasionar daños significativos (Pei Wen et al., 2016). La inflamación crónica es considerada un factor de riesgo para el desarrollo de muchas enfermedades, entre las que se encuentran: artritis reumatoide, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 y diferentes tipos de cáncer (Granot et al., 2004; Penton-Rol et al., 2009; Desai et al., 2014).

El estímulo inflamatorio puede ser causado por una variedad de condiciones incluyendo el EO, el cual está íntimamente relacionado con procesos de inflamación, dado que todos los procesos inflamatorios implican la liberación de ERO provenientes del estallido respiratorio de los neutrófilos activados, quienes al mismo tiempo envían señales para la liberación de citocinas, generando inflamación (Granot et al., 2004; Penton-Rol et al., 2009; Desai et al., 2014).

El EO produce inflamación a través de la activación de múltiples vías. Por mencionar un ejemplo, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) induce la inflamación mediante la activación del factor de transcripción $NF-\kappa\beta$. El EO también juega un papel importante en la activación del inflamasoma de la proteína receptora NOD 3 (NLRP3). El inflamasoma NLRP3 es un complejo molecular oligomérico que activa en SI innato a través de la activación de las citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-8. Está demostrado que las ERO liberadas de las mitocondrias dañadas activan los inflamasomas NLRP3, provocando inflamación localizada. Por lo tanto, la inflamación y el EO se encuentran estrechamente relacionados y son procesos fisiopatológicos interdependientes (Penton-Rol et al., 2009; Ali et al., 2020).

2.3 Sistemas antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que actúan inhibiendo la formación de RL, previniendo la oxidación de sustratos o neutralizando los RL mediante la donación de electrones para convertirlos en compuestos químicamente estables y de esta manera evitar el daño a nivel celular (Mutinati et al., 2014). Las moléculas antioxidantes que cumplen con la función de defensa en las células actúan a diferentes niveles: 1) prevención de formación de agentes oxidantes, 2) eliminación de agentes oxidantes, 3) reparación de daño inducido por agentes oxidantes y 4) mecanismo de adaptación para la prevención de formación o reacción de agentes oxidantes (Ighodaro & Akinloye, 2018).

La primera línea de defensa está constituida por antioxidantes presentes en el organismo que actúan para suprimir o prevenir la formación de RL o especies reactivas a nivel celular. Estos antioxidantes son muy rápidos neutralizando cualquier molécula con el potencial de convertirse en RL o cualquier RL con la habilidad de inducir la producción de otros radicales. Este grupo está constituido por tres enzimas clave, SOD, GPx y CAT (Ighodaro & Akinloye, 2018).

La CAT es una enzima presente en casi todos los tejidos aeróbicos. Esta enzima está compuesta por cuatro subunidades idénticas de 60 kDa, cada una de las cuales contiene un grupo hemo activo y NADPH. El grupo hemo está formado por un ion hierro (Fe^{3+}) unido a un anillo de porfirina. La principal función de esta enzima es catalizar la descomposición de H_2O_2 a agua y oxígeno molecular, utilizando hierro como cofactor. Esta reacción se divide en dos etapas: en la etapa 1 el grupo hemo de la catalasa reacciona con el H_2O_2 y forma un intermediario, el cual es un complejo hierro oxidado (Fe^{4+}) – porfirina (oxiferril porfirina). En esta etapa también se forma una molécula agua. En la etapa 2 se lleva a cabo la reducción de la oxiferril porfirina, en la cual se emplea una segunda molécula de H_2O_2 dando lugar a una molécula de agua (H_2O) y una de oxígeno. En la **Figura 1** se muestra la reducción del H_2O_2 por la CAT (Ighodaro & Akinloye, 2018; Gebicka et al., 2019; Ali et al., 2020).

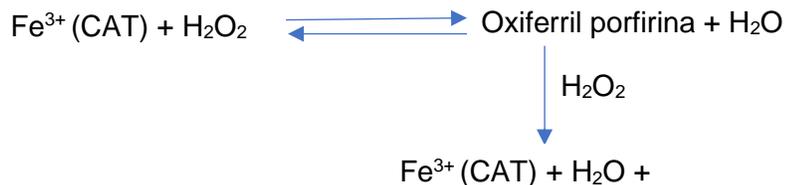
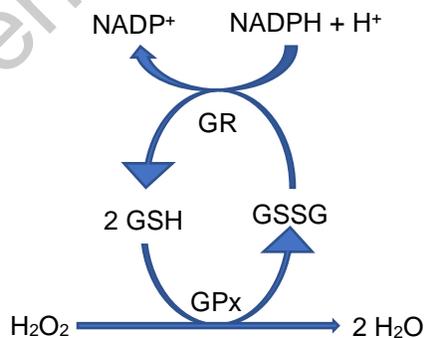


Figura 1. Reducción del H₂O₂ llevada a cabo por la CAT.

Adaptada de Nicholls et al. (2000).

La CAT es una enzima altamente eficiente, ya que puede romper millones de moléculas de H₂O₂ en un segundo. Se encuentra localizada principalmente en los peroxisomas, pero ausente en las mitocondrias de las células de los mamíferos. Por lo tanto, la reducción del H₂O₂ en la mitocondria es llevada a cabo por la GPx (Ighodaro & Akinloye, 2018; Sepasi et al., 2018).

La GPx es una familia de enzimas que requieren GSH como sustrato. Esta enzima se encuentra compuesta por cuatro subunidades idénticas de 21 kDa y cada unidad contiene un residuo de selenocisteína. Esta enzima cataliza la reducción de H₂O₂ orgánico e inorgánico a H₂O y los alcoholes correspondientes, utilizando GSH como cofactor, en la **Figura 2** se muestra la reducción del H₂O₂ por medio de la GPx. También juega un papel importante frente a las ERO y es la primera enzima



activada ante altos niveles de las moléculas previamente mencionadas (Ali et al., 2020)

Figura 2. Reducción de H₂O₂ por medio de la enzima GPx.

Adaptada de Lushchak. (2011).

El GSH además de fungir como cofactor de la enzima GPx, también puede ejercer su acción de manera independiente, actuando como un antioxidante directo al interactuar con ERO o ERN. Por lo tanto, este compuesto pertenece a la segunda línea de defensa, la cual está constituida por otros antioxidantes como: ácido ascórbico, ácido úrico y vitamina E. Estos antioxidantes se encargan de neutralizar los RL por medio de la donación de electrones y en el proceso, se transforman en RL. Sin embargo, estos nuevos RL no son dañinos y son neutralizados rápidamente por otras moléculas antioxidantes (Ighodaro & Akinloye, 2018).

El GSH es un tripéptido de bajo peso molecular y es considerado la molécula antioxidante no enzimática más importante. Se sintetiza en la célula por medio de la adición de la cisteína a glutamato, seguida por la adición de glicina. En la **Figura 3** se muestra la síntesis del GSH. El grupo sulfhidrilo de la cisteína está relacionado con las reacciones de reducción y conjugación, las cuales se encargan de la reducción de peróxidos y xenobióticos. La función primordial del GSH consiste en neutralizar especies reactivas (Vincenzini et al., 1992; Forman et al., 2009; Nair et al., 2017).

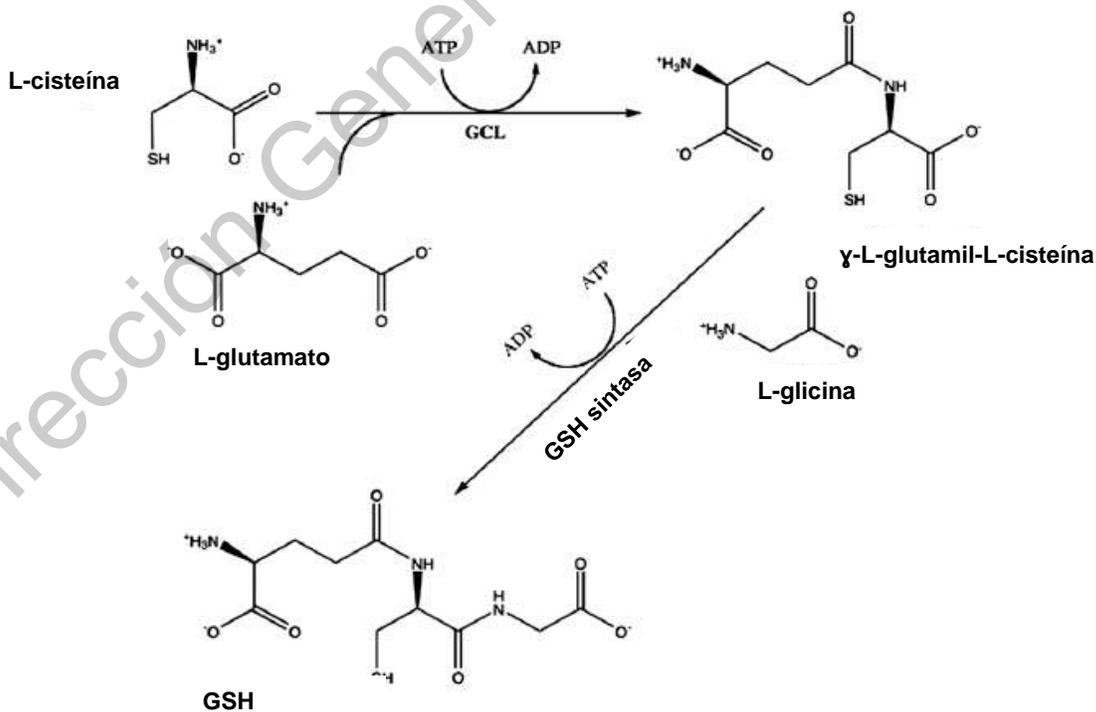


Figura 3. Síntesis de GSH.

Adaptada de Forman et al. (2009).

Por lo tanto, el GSH desempeña un papel fundamental reduciendo el EO, manteniendo el equilibrio redox y mejorando la desintoxicación metabólica (Ali et al., 2020).

2.4 Leche materna. Composición y beneficios

La leche humana es un fluido complejo y dinámico (Hassiotou & Geddes, 2015) secretado por la glándula mamaria, provee nutrición y protección para el desarrollo del lactante (de la Torre & Chávez-Servín, 2017), se digiere con facilidad, es altamente accesible y de bajo costo, también es fuente de nutrimentos, elementos antiinfecciosos, inmunológicos, antiinflamatorios, antioxidantes, receptores solubles, factores de crecimiento, microbiota, entre otros, identificados globalmente como factores bioactivos (Ustundag et al., 2005; Xavier et al., 2011; Matos et al., 2015; Andreas et al., 2016; de la Torre & Chávez-Servín, 2017; Dawod et al., 2019).

Estos factores bioactivos derivan tanto de las células epiteliales de la glándula mamaria, como de las células inmunitarias encontradas en la leche materna (LM) y de la circulación materna. Los factores bioactivos operan en redes y producen una cascada de efectos que contribuyen a la orquestación, especialización y función del sistema inmunológico (SI), a través de mecanismos que incluyen: actividad antimicrobiana directa o indirecta modulando la función inmunológica y efectos antiinflamatorios (también directos e indirectos), favoreciendo el crecimiento y desarrollo de los tejidos del lactante (Ustundag et al., 2005; Castellote et al., 2011; Dawod et al., 2019).

La LM se clasifica en calostro, leche de transición y leche madura de acuerdo con la evolución en el tiempo. Esta clasificación se refiere a los cambios graduales en la composición de la leche durante la lactancia, respondiendo a las necesidades en cada etapa de desarrollo del lactante (Andreas et al., 2016).

El calostro es producido en un volumen de 2 a 20 mL/d durante los primeros cuatro días después del parto, es rico en componentes inmunológicos como la inmunoglobulina A secretora (IgAs), lactoferrina, leucocitos y factores de desarrollo como el factor de crecimiento epidérmico. El calostro contiene gran cantidad de vitaminas liposolubles, β -carotenos, lactobacilos *Bifidus*, hierro y zinc. Por otro lado, el calostro tiene relativamente bajas concentraciones de lactosa, lípidos, glucosa y vitaminas hidrosolubles en comparación con la leche madura (García-López, 2011; Ballard & Morrow, 2013; de la Torre & Chávez-Servín, 2017).

El calostro tiene una función trófica e inmunológica importante, brinda inmunidad pasiva al recién nacido por medio de inmunoglobulinas, además de contener de 2000 a 4000 linfocitos/mm³ y altas concentraciones de lisozima, lo cual protege al neonato frente a la exposición a múltiples agentes patógenos al nacer (García-López, 2011; Ballard & Morrow, 2013; Andreas et al., 2016; Doare et al., 2018).

La leche de transición se produce entre los días 4 a 5 postparto. En comparación con el calostro, en esta etapa disminuye la concentración de inmunoglobulinas y proteínas e incrementa la concentración de lactosa, grasas y vitaminas hidrosolubles, representa un periodo de aumento de la producción de la leche alcanzando un volumen de 660 mL/d para satisfacer las necesidades nutrimentales y de desarrollo del bebé en rápido crecimiento. Su composición varía hasta llegar a la leche madura (García-López, 2011; Ballard & Morrow, 2013; Aguilar-Cordero et al., 2016; de la Torre, K. & Chávez-Servín, 2017;).

A partir de las semanas cuatro a seis después del parto, la LM se considera completamente madura. En esta fase la leche también experimenta variaciones en función de la etapa de la lactancia, la hora del día, la alimentación y el estado nutricional de la madre, el estado de salud de la diada y la edad gestacional del bebé. Tiene más proteínas, vitaminas liposolubles (A, E, K) y carotenos en comparación con la leche de transición. También es superior en el contenido de nutrimentos inorgánicos como sodio, zinc, hierro, azufre, potasio, selenio y manganeso (Ballard & Morrow, 2013; Aguilar-Cordero et al., 2016). Su volumen promedio es de 750 mL/d estando

constituida en un 87 % por agua, aporta de 670 a 700 kcal/L principalmente a través de hidratos de carbono y lípidos, siendo la lactosa el principal hidrato de carbono que la conforma (García-López, 2011).

De los factores bioactivos presentes en la leche, muchos de ellos son capaces de inhibir la inflamación y de mejorar la producción de anticuerpos específicos. Estos factores bioactivos incluyen inmunoglobulinas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, hormonas, lactoferrina, enzimas antioxidantes, entre otros (Andreas et al., 2016; Doare et al., 2018).

Las citocinas son uno de los factores bioactivos más importantes de la LM (Gregory & Walker, 2013). Son proteínas hidrosolubles, de bajo peso molecular (15-20 kDa) importantes en señalización autocrina, paracrina y endocrina y coordinan el desarrollo y actividad del SI (Penton-Rol et al., 2009). Son responsables de la comunicación celular durante la inflamación y actúan como reguladoras del crecimiento, maduración y respuesta de las células del SI (Valaperti, et al., 2020). Aquellas citocinas que regulan los procesos de inflamación son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las interleucinas (IL): IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-8 (Penton-Rol et al., 2009).

Las citocinas derivadas de las secreciones mamarias son requeridas para proteger al recién nacido contra infecciones y participan en la estimulación activa de su SI, lo cual puede estar relacionado con su capacidad para establecer conexiones con las células al cruzar la barrera intestinal. Estas citocinas también participan en el desarrollo de órganos y en una colonización microbiana saludable (Ustundag et al., 2005; Brenmoehl et al., 2018; Gila-Diaz et al., 2019).

En los recién nacidos y bebés, la producción de citocinas es baja, por lo cual, las citocinas de la LM resultan esenciales, ya que interactúan con los tejidos mucosos del tracto respiratorio y el tracto gastrointestinal, proporcionando efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. También se ha observado en estudios realizados *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, que las citocinas tales como el TNF- α tienen actividades esenciales en la maduración, proliferación y reparación

del epitelio intestinal. De esta forma, la LM protege al bebé de patógenos y reduce el riesgo de infecciones (Ustundag et al., 2005; Dawod et al., 2019).

La IL-1 β es una de las citocinas proinflamatorias más abundantes en la LM y parece estar involucrada en los mecanismos de defensa que promueven la producción de IgA y otras citocinas como la IL-6 y TNF- α en la leche (Pei Wen et al., 2016; Freitas et al., 2019). La IL-1 β activa la secreción de TNF- α por los monocitos y células T, para generar esta citocina que a su vez, activa los macrófagos y apoya al establecimiento de la inmunidad celular en el bebé (Brenmoehl et al., 2018).

El TNF- α es una proteína multifacética que tiene funciones inflamatorias, apoptóticas, necróticas, de defensa y proangiogénicas. El TNF- α en la LM es sintetizado principalmente por macrófagos de la leche y por el epitelio mamario (Ustundag et al., 2005; Valaperti et al., 2020). Esta citocina defiende al lactante contra infecciones, equilibrando la baja producción por parte del recién nacido y sin causar inflamación, lo cual puede ser resultado de la presencia de sus receptores específicos en la LM (Ustundag et al., 2005).

El TNF- α es también un modulador del desarrollo y ramificación de la glándula mamaria, lo cual podría tener impacto en el suministro disponible y los componentes de la LM (Dawod et al., 2019).

Las citocinas tienen un gran potencial como marcadores de diagnóstico y pronóstico que ya son usadas en la actualidad para estos fines en combinación con otros factores diagnósticos y clínicos (Valaperti et al., 2020).

La LM también cuenta con distintos sistemas de defensa antioxidante, entre los cuales se encuentran el GSH, la enzima CAT que previene la formación de RL o H₂O₂, así como la GPx que cataliza la reducción de peróxidos. También se encuentran antioxidantes no enzimáticos como la vitamina A, vitamina E y vitamina C, la coenzima Q, compuestos fenólicos y otras moléculas con estas propiedades como la melatonina, lo que le confiere una acción directa antioxidante y protege a

los lactantes de la peroxidación causada por los RL (Tijerina-Sáenz et al., 2009; Xavier et al., 2011; Illnait-Ferrer, 2012; Arana et al., 2017).

Gracias a su extensa variedad de compuestos nutrimentales y factores bioactivos, la LM brinda diversos beneficios al lactante, tanto a corto como a largo plazo, incluidos entre estos, menor incidencia de infecciones gastrointestinales, infecciones de las vías respiratorias u otitis media en los primeros años de vida en comparación con los lactantes alimentados con fórmula infantil (FI) y un menor riesgo a desarrollar sobrepeso, obesidad, diabetes mellitus 2 e hipertensión, entre otras enfermedades en la edad adulta (Hassiotou & Geddes, 2015; Witkowska-Zimny & Kaminska-El-Hassan, 2017).

La composición inigualable de la LM y los beneficios que otorga la hacen por excelencia, el mejor alimento para el lactante. La LM es capaz de cambiar su composición para adaptarse a las necesidades del bebé en función del periodo de lactancia, la hora del día, el estado de salud de la diada e incluso a lo largo de una misma toma (Gregory et al., 2014; Aly et al., 2016).

Las FI en su mayoría elaboradas a base de leche de vaca, mantienen una composición constante, carecen de enzimas digestivas clave y factores favorecedores de la absorción de nutrimentos y no brinda factores inmunológicos, los cuales son primordiales en la protección del bebé frente a patógenos (Gregory et al., 2014; Aly et al., 2016). A pesar de que las FI se encuentran en constante cambio con el fin de igualar o asemejar en la medida de lo posible las características de la leche humana, y aún cuando están diseñadas para contener nutrimentos con características y en cantidades similares a las encontradas en la LM, un sin número de componentes presentes en la leche humana, su característica y comportamiento son imposibles de replicar (Gregory et al., 2014; Aly et al., 2016).

El reto para la industria de las FI va más allá de alcanzar las concentraciones ideales de macronutrimentos y micronutrimentos; va en virtud de hacer de la FI un alimento funcional que logre los efectos fisiológicos observados en los lactantes que reciben LM. El reto mayor para la industria de las FI es enriquecerlas con los componentes funcionales encontrados de manera natural en la LM y, si bien, hoy

en día las FI ya cuentan con factores bioactivos como lo son prebióticos, probióticos, lactoferrina, α - lactoalbúmina y ácidos grasos poliinsaturados (ácido araquidónico y docosahexaenoico), la composición de la leche humana en su totalidad, así como su dinamismo y la respuesta a las necesidades del lactante, termina siendo inigualable (Aly et al., 2016).

De acuerdo con la OMS, solo se considera contraindicada la lactancia por parte de la madre en los siguientes casos: enfermedad grave que impida que la madre pueda cuidar a su lactante, herpes simple tipo I, medicamentos psicoterapéuticos sedantes, antiepilépticos y opioides, ante el uso de iodo radioactivo, uso excesivo de yodo o yodóforos tópicos, quimioterapia citotóxica y virus de inmunodeficiencia humana si la alimentación con FI es aceptable, factible, asequible, sostenible y segura. Las contraindicaciones por parte del lactante son: diagnóstico de galactosemia clásica, enfermedad de la orina en jarabe de arce y fenilcetonuria (OMS, 2010). El uso de FI como una alternativa para contribuir a la seguridad alimentaria y nutrición debe quedar limitada a las circunstancias que verdaderamente lo ameriten en este sector de la población.

2.5 Sistema inmunológico en lactantes

El periodo posparto marca una ventana crucial, y a la vez de oportunidad para el desarrollo del bebé, en la cual los factores dietéticos y ambientales tendrán gran impacto en su salud tanto a corto como a largo plazo, cumpliendo un papel importante en la especialización del SI. Este periodo coincide con el comienzo de la lactancia, la cual estará presente en tres modalidades principales: lactancia materna exclusiva (LME), FI o una combinación de ambas: lactancia mixta (Gregory & Walker, 2013; Dawod et al., 2019).

La susceptibilidad de los neonatos a las enfermedades infecciosas es una consecuencia directa de la difícil adaptación inmunológica durante el periodo de transición del ambiente intrauterino al ambiente extrauterino. La ontogenia del SI comienza desde el embrión y se completa años después del nacimiento. La inmunidad innata es de gran importancia durante los primeros años de vida, ya que

la especialización del SI adaptativo se realizará mediante interacciones con el medio ambiente en las superficies mucosas (Chirico et al., 2008; Gregory & Walker, 2013).

El feto, desarrollado en un ambiente relativamente estéril, carece de experiencia antigénica. Durante la vida fetal se presenta una respuesta citotóxica reducida, así como una baja respuesta de linfocitos T frente a antígenos, baja especialización de linfocitos T y B, síntesis inadecuada de citocinas, deficiencia en la producción de anticuerpos y baja actividad de neutrófilos, sistema de complemento y células natural killer, siendo todos estos factores responsables del SI poco especializado del lactante que lo hacen más susceptible frente a antígenos infecciosos y ambientales sobre todo a nivel de las membranas mucosas (Chirico et al., 2008; Garofalo, 2010; Brenmoehl et al., 2018).

Por lo tanto, la LM, además de nutrir, se encarga de mantener el vínculo inmunológico materno-fetal y favorece la transmisión de inmunocompetencia de la madre al bebé contribuyendo al sistema de defensa neonatal durante un periodo delicado y crucial. Razón por la cual, la LM se ha considerado como la primera vacuna que recibe el lactante, brindando inmunidad pasiva que ayuda a prevenir enfermedades infecciosas, principalmente aquellas del tracto respiratorio y gastrointestinal, evitando la traslocación de patógenos (Schack-Nielsen et al., 2007; Chirico et al., 2008; Garofalo, 2010; García-López, 2011; Andreas, et al., 2016).

La habilidad de la leche humana de proveer protección pasiva y modular el desarrollo de las respuestas inmunitarias sistémicas y de las membranas mucosas está ligada a una mezcla de sustancias con actividad antimicrobiana, antiinflamatoria e inmunomoduladora. La LM también puede contribuir a una estimulación activa del SI del bebé por medio de la transferencia de citocinas y factores de crecimiento (Ustundag et al., 2005; Schack-Nielsen et al., 2007; Garofalo, 2010).

Las citocinas presentes en la LM tienen funciones importantes en el SI del lactante y son producidas en la glándula mamaria por células epiteliales mamarias o por células de la leche como los leucocitos, principalmente células T y macrófagos. Las citocinas son partícipes en la respuesta inmunológica, el desarrollo de tejidos,

pueden actuar como hormonas, también sirven como agentes pro y antiinflamatorios, regulan respuestas inflamatorias estimuladas por antígenos, funcionan como neutralizadores de los efectos dañinos de patógenos y como inductores de especialización y desarrollo del SI (Chirico et al., 2008; Gregory & Walker, 2013; Brenmoehl et al., 2018).

Una vez que el lactante ha nacido, es necesaria la exposición al antígeno para la especialización de las funciones inmunológicas y el crecimiento de los órganos inmunológicos (timo). Las citocinas proinflamatorias preparan a los linfocitos intestinales para proteger a los recién nacidos frente a diversas infecciones inmediatamente después del nacimiento. Las citocinas en el calostro estimulan la liberación de IL-1 β , IL-3 e IL-6 de las células mononucleares de la sangre periférica del lactante. La IL-1 β activa la secreción de TNF- α por parte de los monocitos y las células T auxiliares para generar citocinas que, a su vez, activarán los macrófagos y apoyarán el establecimiento de la inmunidad celular del lactante (Chirico et al., 2008; Brenmoehl et al., 2018).

La LM también contiene factores bioactivos que son capaces de inhibir la inflamación, como los antioxidantes, las IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10, factor de crecimiento transformante, inhibidores de proteasa de leucocitos secretores y defensina 1 (Andreas et al., 2016).

La función de la LM va más allá de la nutrición, la LM es también protección. El SI de la leche humana, además de proteger al lactante nacido a término, protege a aquellos lactantes nacidos pretérmino. La función de la LM varía también en función de la edad gestacional. El lactante prematuro es más susceptible a desarrollar infecciones y daño causado por los procesos inflamatorios (Ustundag et al., 2005; Castellote et al., 2011) y según lo encontrado por Castellote et al. (2011), aunque en los bebés extremadamente prematuros esta respuesta compensatoria parece difícil de desencadenar, se mostró que los mecanismos compensatorios lactogénicos aceleran el desarrollo de los lactantes pretérmino nacidos después de las 30 semanas de gestación (SDG).

2.6 Estrés oxidativo en lactantes

Las ERO tienen efectos tanto benéficos como dañinos en el organismo. Dentro de los efectos dañinos se encuentra el EO, el cual ocurre cuando la producción de ERO sobrepasa la capacidad antioxidante o cuando el sistema antioxidante funciona de manera inadecuada. En otras palabras, el EO se origina cuando se pierde el equilibrio entre los RL y los antioxidantes. En el lactante este EO está implicado en enfermedades neonatales y podría tener un efecto también a largo plazo (Granot et al., 2004; Gitto et al., 2012; Yuksel et al., 2015; Aceti et al., 2018).

Al nacer, se estima que el lactante soporta tensiones de oxígeno aproximadamente 5 veces superiores a las que experimenta en su vida intrauterina; mientras que, en los prematuros, son 10 veces más. El cambio del ambiente intrauterino en donde el feto está expuesto a condiciones de hipoxia (PO_2 20-25 mmHg), al ambiente extrauterino con condiciones normóxicas (PO_2 100 mmHg), produce en el lactante un cambio drástico que lo lleva a la necesidad de una adaptación súbita sistémica y pulmonar. Esta transición pulmonar se basa en una distensión alveolar debida a la inspiración, que a su vez activa la sintasa de óxido nítrico endotelial, la cual es una enzima implicada en la generación de óxido nítrico. Lo anterior lleva a la vasodilatación, permitiendo una adaptación gradual del sistema cardiovascular neonatal; además, las primeras respiraciones también implican un aumento en la generación de ERO que si no son neutralizadas de manera adecuada por medio de los sistemas antioxidantes producen EO (Sandal et al., 2013; Mutinati et al., 2014; Yuksel et al., 2015; Aceti et al., 2018).

Los pulmones de los lactantes pretérmino sufren una lesión más grave que aquellos de los lactantes a término. Con las primeras respiraciones postnatales, el estiramiento excesivo que se produce, debido al volumen alveolar reducido, el déficit de líquido surfactante y la matriz celular no completamente desarrollada, representan factores predisponentes para el desarrollo de inflamación pulmonar crónica y aumento en la generación de ERO, si aunado a esto, existe la necesidad de que esté expuesto a la oxigenoterapia, este efecto es aún mayor. Dicho todo lo

anterior se puede afirmar que el recién nacido a término y pretérmino es más susceptible a desarrollar EO que los niños o los adultos (Gitto et al., 2012; Mutinati et al., 2014).

Buonocore & Perrone. (2006) observaron que la concentración de hidroperóxidos totales y los productos proteínicos oxidativos avanzados aumentaron en el plasma de neonatos a término y pretérmino desde el nacimiento hasta los 7 días de vida, dando señal que el EO comienza de manera temprana en un grupo de población particularmente susceptible.

Esta susceptibilidad de los recién nacidos al daño oxidativo es secundaria a una menor respuesta del sistema antioxidante en la cual, la actividad de las enzimas GPx, SOD y CAT y los niveles de vitamina E y ácido ascórbico, son bajos. Se ha observado en estudios con modelos animales, que la actividad de las enzimas antioxidantes aumenta en las últimas semanas del embarazo; por esta razón, los neonatos prematuros resultan aún más vulnerables (Buonocore & Perrone, 2006; Sandal et al., 2013).

Durante el periodo perinatal, la hiperoxia, la reperfusión isquémica, la hipoxia, la activación de neutrófilos y macrófagos y el metabolismo de las prostaglandinas en los neonatos, y más específicamente en los prematuros, incrementan la toxicidad por RL y sus productos (peroxidasa lipídica y proteínicas). Lo anterior aumenta el EO, el cual puede contribuir al daño de las membranas celulares por medio de la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas que pueden desencadenar alteraciones en su estructura o daño en ADN induciendo fragmentación, modificaciones de bases y roturas de hebras que resultan en mutaciones, procesos degenerativos y oncogénesis (Buonocore & Perrone, 2006; Sandal et al., 2013; Mutinati et al., 2014).

La asfixia perinatal, en el feto o el neonato, es resultado de la hipoxia o isquemia; si bien, prácticamente todos los órganos del cuerpo se ven afectados por la asfixia que conduce a un daño multiorgánico, la agresión más grave se produce en el sistema nervioso central. El mecanismo de lesión celular después de la hipoxia o isquemia es poco conocido, puede estar mediado por una liberación excesiva de

neurotransmisores, la generación de ERO y ERN y el inicio de la peroxidación lipídica (Gitto et al., 2012).

Los eritrocitos fueron las primeras células en revelar la susceptibilidad de los recién nacidos ante el EO, probablemente porque estas células presentan una mayor sensibilidad a la peroxidación durante esta etapa. El EO provoca la oxidación de la hemoglobina y el daño de la membrana de los eritrocitos a través de la reacción de Fenton. Este daño a glóbulos rojos al igual que en otras células depende del equilibrio de producción y eliminación de ERO (Buonocore & Perrone, 2006). Además de esto, los altos valores de ácidos grasos poliinsaturados que presentan las membranas celulares de neonatos al compararlas con las membranas celulares de los adultos, las hace aún más susceptibles al proceso de oxidación.

Teniendo en cuenta lo anterior se ha postulado que el EO está implicado en el desarrollo de enfermedades neonatales que pueden deteriorar la vitalidad y el crecimiento del lactante, así como afectar su desarrollo fisiológico. Entre estas enfermedades están displasia broncopulmonar, enfermedad pulmonar crónica, leucomalacia periventricular, encefalopatía neonatal, retinopatía del prematuro, disfunciones renales neonatales y enterocolitis necrotizante, las cuales son conocidas colectivamente como “enfermedades relacionadas con RL” (Shoji et al., 2003; Yao et al., 2010; Gitto et al., 2012; Sandal et al., 2013; Mutinati et al., 2014).

Naturalmente el organismo se encuentra expuesto a oxidantes originados por fuentes tanto exógenas como endógenas. En las fuentes exógenas se incluyen contaminantes del aire, gases nocivos, productos químicos, toxinas, bacterias patógenas y virus. Mientras que, las fuentes endógenas incluyen enzimas que indirectamente producen ERO. Los neutrófilos también pueden contribuir a la producción de ERO, ya que después de su activación estos experimentan un estallido respiratorio dando como resultado liberación de estos compuestos, principalmente anión superóxido (O_2^-), H_2O_2 y ácido hipocloroso (HOCl), y de proteínas catiónicas, entre otros, que favorecen a la muerte bacteriana. Estos compuestos también pueden actuar sinérgicamente para causar daño oxidativo en los tejidos (Buonocore & Perrone, 2006; Granot & Kohen, 2004).

Nuestro organismo se ha adaptado para sobrevivir bajo un flujo continuo de ERO a nivel celular, que a concentraciones basales juegan papeles muy importantes en los mecanismos de defensa y homeostasis. Entre los mecanismos de adaptación del organismo, los sistemas antioxidantes son de gran importancia (Granot & Kohen, 2004).

Para el lactante, la LM resulta ser el mejor protector ya que, a comparación de la FI, cuenta con propiedades antioxidantes que neutralizan los RL y reducen la formación de radicales peroxilo en los neutrófilos. La nutrición infantil temprana resalta, por lo tanto, la importancia del rol de la lactancia en maximizar la especialización del SI y la protección del lactante contra infecciones y ante el EO (Shoji et al., 2003; Yao et al., 2010; Sandal et al., 2013; Hassiotou & Geddes, 2015; Matos et al., 2015; Yuksel et al., 2015; Aceti et al., 2018).

La LM es, entonces, un mediador de protección dinámico que se ajusta a las necesidades del lactante y a menudo funge como factor determinante para la recuperación y supervivencia del neonato, ya que se ha demostrado que aquellos lactantes alimentados al seno materno, presentan menor riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con RL, reducen su susceptibilidad gastrointestinal, respiratoria y a otras infecciones en comparación con los lactantes alimentados con FI (Sandal et al., 2013; Mutinati et al., 2014; Hassiotou & Geddes, 2015). Los lactantes alimentados con FI carecen de los efectos protectores brindados por los sistemas antioxidantes y demás factores bioactivos que son capaces de reducir el estímulo inflamatorio. La capacidad antiinflamatoria de la LM está íntimamente relacionada con su capacidad antioxidante y en ausencia de esta los lactantes quedan vulnerables frente a situaciones de EO e inflamación. Es por esto por lo que la ausencia de lactancia materna y el consumo de FI se han relacionado con el desarrollo de procesos inflamatorios en el organismo del lactante, que pueden dar pie al desarrollo de enfermedades graves tanto a corto como a largo plazo. La LM tiene efectos positivos en la prevención del desarrollo de diferentes desordenes y patologías que no se limitan a la infancia, sino que tiene beneficios durante toda la vida (Hsieh et al., 2015).

Ejemplo de lo anterior es la evidencia de la relación de la lactancia materna y la prevención de enfermedades no infecciosas como obesidad, aterosclerosis, diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2, alergias, procesos patológicos autoinmunes graves, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, artritis reumatoide y cáncer, entre otras (Hsieh et al., 2015). Muchas de estas enfermedades se relacionan con procesos de inflamación y EO, y que pueden comenzar desde la primera etapa de la vida.

2.7 La saliva como medio para el análisis

La monitorización cercana de los agentes de inflamación y sistemas antioxidantes puede lograrse mediante técnicas no invasivas como es el análisis por medio de saliva (Pei Wen et al., 2016). La saliva es un fluido de composición compleja y parecida al plasma, contiene moléculas orgánicas e inorgánicas, es ligeramente ácida (pH = 6.0-7.0) y su composición consta de 99 % agua y el resto (1 %) iones, electrolitos, minerales, mucinas, proteínas plasmáticas, leucocitos, hormonas, enzimas, inmunoglobulinas, citocinas y otros compuestos (Greabu et al., 2009; Spielmann et al., 2011; Maciejczyk et al., 2018).

Tres pares de glándulas principales se encargan de la secreción del 90 % de la saliva total, la glándula parótida, submandibular y sublingual. También existen otras glándulas menores debajo de la mucosa oral que se encargan de la producción del restante 10 %; por lo tanto, la composición de la saliva dependerá del tipo de glándula en la que es producida. La saliva total no estimulada es producida en un 60 % en las glándulas submandibulares y en un 20 % por las glándulas parótidas; mientras que, la saliva estimulada es producida en un 50 % en las glándulas submandibulares y 40 % en las glándulas parótidas. Las glándulas parótidas van a brindar el aporte principal de antioxidantes salivales (Spielmann et al., 2011; Maciejczyk et al., 2018).

La saliva tiene múltiples funciones fisiológicas como la digestión oral, la deglución, la degustación de alimentos, lubricación de los tejidos, mantenimiento de la integridad dental, protección antibacteriana y antiviral, y puede representar el medio perfecto para el análisis y la vigilancia de la salud (Spielmann et al., 2011).

De manera general, las sustancias químicas contenidas en la saliva se pueden clasificar de dos formas: compuestos producidos en las glándulas salivales y los transportados del plasma a la saliva, lo que resulta de gran importancia al momento de usar la saliva como herramienta diagnóstica, ya que muchos de sus componentes reflejan su concentración en plasma (Maciejczyk et al., 2018).

El transporte de compuestos de la sangre a la saliva se realiza al pasar a través de las células por difusión intracelular pasiva y transcelular y transporte activo, o rutas paracelulares por ultrafiltración extracelular dentro de las glándulas salivales o a través del surco gingival, por la cual los compuestos que se encuentran en la sangre también pueden encontrarse en la saliva, aunque en menor proporción (Spielmann et al., 2011).

El muestreo de saliva es un procedimiento no invasivo de fácil recolección, tiene un bajo costo y no genera estrés, además presenta una vida útil relativamente larga en comparación con la sangre (Greabu et al., 2009; Pei Wen et al., 2016; Maciejczyk et al., 2018), lo que lo hace un proceso más seguro y factible, principalmente en población infantil. El uso de saliva tiene un gran potencial en estudios dirigidos a analizar la magnitud, el curso a través del tiempo y la variabilidad en respuestas inmunitarias (Pei Wen et al., 2016; Nair et al., 2017), ya que sus componentes actúan como espejo de la salud del organismo (Greabu et al., 2009). Por lo anterior, el análisis de saliva en lactantes puede ser de gran utilidad para evaluar el efecto de la lactancia materna sobre marcadores antioxidantes y de inflamación.

2.8 Antecedentes

Existe un creciente interés en la comunidad científica por conocer los compuestos de la LM que desempeñan funciones de protección en los lactantes, así como investigar los efectos que estos compuestos tienen sobre su organismo. También hay un gran interés sobre el uso de métodos alternativos al muestreo de sangre para el análisis del estado fisiológico en diferentes grupos poblacionales. Frente a esto, el uso de saliva como herramienta diagnóstica ha destacado dado

sus ventajas, las cuales son principalmente menor costo, mayor accesibilidad y menor índice de estrés entre los participantes.

Los estudios en donde se utiliza la saliva como prueba diagnóstica en lactantes aún son escasos. Si bien, estos estudios son utilizados en la actualidad para medir sistemas antioxidantes, marcadores de inflamación y capacidad antioxidante total, son realizados mayormente en niños o en adultos, predominando entre los lactantes el uso de muestras de sangre y orina.

En cuanto a la evaluación de sistemas antioxidantes Da Silva et al. (2016) analizaron muestras de saliva no estimulada en 60 niños de un rango de edad de 0 a 3 años. El objetivo fue evaluar los niveles de EO y los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos frente a la presencia de caries severa en la primera infancia. La población fue dividida en dos grupos, grupo de caries severa en la primera infancia y grupo libre de caries. Para evaluar la capacidad antioxidante total se realizó la prueba de FRAP y en cuanto a los sistemas antioxidantes enzimáticos se midió la SOD. La capacidad antioxidante resultó mayor ($p < 0.05$) en la saliva de los niños con presencia de caries, lo mismo se observó con los sistemas antioxidantes enzimáticos ($p < 0.05$) y no enzimáticos ($p < 0.0001$). Los autores sugirieron que el aumento de la actividad de los sistemas antioxidantes podría ser un mecanismo compensatorio para reducir el daño oxidativo, ya que su función es proteger a los tejidos orales contra los efectos dañinos de las ERO endógenas o exógenas.

Maciejczyk et al. (2018) reportaron resultados similares al evaluar indicadores de EO, sistemas antioxidantes y estado oxido-reductor en saliva y plasma de niños de 5 a 18 años con enfermedad renal crónica (ERC) ($n = 25$) y en un grupo control ($n = 25$). Estos investigadores notaron un incremento en la actividad de los sistemas antioxidantes en el grupo de casos, en donde la saliva estimulada tuvo una actividad aumentada de la SOD y GPx ($p < 0.0005$ y $p < 0.05$ respectivamente). La capacidad antioxidante total también mostró valores más altos ($p = 0.0054$); mientras que, el GSH fue significativamente menor en este mismo grupo ($p = 0.0299$) al compararlo con los controles sanos.

Referente al análisis de marcadores de inflamación en muestras de saliva Riis et al. (2015) realizaron un estudio en saliva de 125 niños de 5 años de edad en donde se examinaron las intercorrelaciones de las citocinas y las asociaciones con factores demográficos y de salud. Las citocinas se midieron por medio de inmunoensayo de electroquimioluminiscencia obteniendo una concentración de IL-1 β de 212.12 ± 417.50 pg/mL y de TNF- α de 4.18 ± 8.55 pg/mL ($X \pm DE$). Winkler et al. (2001) también midieron la concentración de marcadores de inflamación en muestras de saliva de 147 niños en un rango de edad de 8 a 10 años, con el objetivo de detectar marcadores proinflamatorios involucrados en la inmunidad local de la cavidad oral. Para la medición del TNF- α se utilizó un kit de ELISA tipo sándwich y se observó una concentración de 6.8 ± 0.5 pg/mL ($X \pm EE$), concluyendo ambos estudios que los procesos inmunológicos orales están altamente coordinados y que la presencia en la cavidad oral de estas citocinas implica la necesidad de estos componentes en la inmunidad local.

Los estudios de evaluación de capacidad antioxidante total se realizan de manera más común en lactantes, en comparación con otro tipo de estudios como la medición de sistemas antioxidantes y marcadores de inflamación. La capacidad antioxidante total en lactantes se analiza principalmente en plasma. Aycicek et al. (2006) realizaron un estudio en donde examinaron el efecto de la LM sobre la capacidad antioxidante total, el peróxido total y el índice de estrés oxidativo (IEO) en plasma de 28 lactantes alimentados con LME y 26 lactantes alimentados con FI con un rango de edad de 3 a 6 meses, encontrando que la capacidad antioxidante total fue significativamente mayor ($p < 0.013$) en el grupo de LME (2.27 ± 0.21 mmol ET/L) en comparación con el grupo de FI (2.02 ± 0.25 mmol ET/L); mientras que, los valores de peróxido total y IEO fueron significativamente menores.

Shoji et al. (2003) obtuvieron resultados similares al comparar los niveles de EO por medio de la medición de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en manchas de orina de 41 lactantes de 1 mes de edad, los cuales se dividieron en 4 grupos: 1) LM ($n = 10$); 2) Mixta (alimentación 50-90 % con LM) ($n = 10$); 3) Mixta (50-90 % FI) ($n = 11$) y 4) FI ($n = 10$). La 8-OHdG es producida a consecuencia del daño

oxidativo al nucleósido desoxiguanosina con su consecuente excreción en la orina; por lo que, este compuesto se utiliza como marcador sensible del daño oxidativo al ADN. En su estudio los autores encontraron que la excreción urinaria de 8-OHdG fue significativamente menor en el grupo de LM en comparación con los grupos de lactancia mixta (50-90 % FI) y FI.

Ledo et al. (2009) también evaluaron los marcadores de EO en manchas de orina de lactantes prematuros alimentados con LM (n=299) o FI (n=34) por medio de la relación 8-OHdG/2'-desoxiguanosina (2dG) y la relación *o-Tyr*/Phe. La *o-Tyr* se forma por la reacción de radicales hidroxilos con fenilalanina, este compuesto se desecha en orina y es considerado un marcador de EO. Como resultado los investigadores observaron al igual que Shoji et al. (2003), que el grupo alimentado con FI tenía una excreción significativamente mayor de 8-OHdG/2dG ($p < 0.02$) y de *o-Tyr*/Phe ($p < 0.01$) en comparación con el grupo alimentado con LM.

Yao et al. (2010) realizaron un estudio en un modelo de cultivo celular gastrointestinal pretérmino *in vitro*, con el fin de analizar las propiedades antioxidantes de la LM, encontrando que la LM mejoró el EO en el cultivo y redujo el daño oxidativo del ADN inducido por el H₂O₂.

Estos últimos estudios concluyeron que la LM ofrece mayor protección antioxidante en el lactante al compararlo con la FI, resultando en un menor daño oxidativo a nivel del ADN (Shoji et al., 2003; Aycicek et al., 2006; Ledo et al., 2009; Yao et al., 2010).

Hay mayor proporción de estudios realizados en LM o FI en comparación con los estudios realizados en muestras biológicas de lactantes. L'Abbe et al. (2000) analizaron muestras de LM a lo largo del tiempo (de la semana 1 a la 8 y en la semana 12 postparto) en madres con lactantes a término (n= 15) y pretérmino (n= 19). El objetivo del estudio fue analizar los cambios en la actividad enzimática de la SOD y GPx y determinar las posibles diferencias en la actividad enzimática de la leche de madres con lactantes a término y pretérmino. Estos investigadores encontraron que la actividad de la GPx fue más elevada en la leche de madres con

lactantes pretérmino en la semana 1, 2 y 7, mientras que la actividad de la SOD se mantuvo más elevada en las muestras de lactantes a término.

Ankrah et al. (2000) analizaron muestras de LM de transición (n= 15) y LM madura (n= 32) de 47 mujeres de 19 a 40 años, en dónde evaluaron los niveles de GSH de acuerdo con el tipo de almacenamiento de la leche, la cual fue dividida en cuatro grupos: 1) Leche fresca, analizada inmediatamente después de su recolección; 2) Leche almacenada a temperatura ambiente por 2 h; 3) Leche almacenada a 4 °C por 2 h y 4) Leche almacenada a -20 °C por 2 h. Los resultados indicaron una pérdida sustancial de GSH de 73 - 80.6 % posterior al almacenamiento.

Un estudio similar al anterior fue llevado a cabo por Xavier et al. (2011) quienes evaluaron la capacidad antioxidante total por medio del método de fosfomolibdato en muestras calostro, leche de transición y leche madura almacenadas bajo diferentes condiciones. Estas muestras se obtuvieron de mujeres con lactantes a término (n=10) y pretérmino (n=10). En el mismo estudio se agregó otra cohorte de 20 mujeres con lactantes a término (n=10) y pretérmino (n=10) que tenían de 5 a 12 meses lactando. Las muestras se almacenaron como a continuación se indica: 1) Temperatura ambiente; 2) Refrigeradas por 48 h a 4 °C; 3) Refrigerada 1 semana a 4 °C; 4) Refrigerada 48 h a -8 °C y 5) Refrigerada 1 semana a -8 °C. Los investigadores observaron una disminución significativa de la capacidad antioxidante, concluyendo al igual que Ankrah et al. (2000) en la importancia de la concientización y la reducción de la práctica de almacenamiento de la LM para su uso posterior.

Dado los resultados encontrados por los estudios anteriores es importante destacar que, aun cuando algunos de los compuestos bioactivos de la LM tienen una vida corta y se ven afectados al ser almacenados en refrigeración o congelación, los beneficios de la LM almacenada frente a la FI siguen siendo mayores.

En otro estudio, Yuksel et al. (2015) analizaron la actividad oxidante y antioxidante de la leche humana durante la lactancia, midiendo los niveles de

malondialdehído (MDA), óxido nítrico, lactoferrina y actividad de la SOD y CAT en muestras de LM de 20 mujeres durante tres periodos de tiempo: 1) 24-48 h postparto; 2) 7 días postparto y 3) 14 días postparto. Las enzimas antioxidantes mostraron mayor actividad en las muestras analizadas de calostro, resaltando su importancia durante las primeras horas de vida del bebé, sin dejar de lado que la reducción de los antioxidantes parece coincidir con las necesidades cambiantes del bebé en crecimiento.

Los marcadores de inflamación fueron evaluados por Riskin et al. (2012) en muestras de leche (n=31) de mujeres con lactantes de 0-3 meses hospitalizados por presentar fiebre con o sin otros síntomas y en muestras de leche de mujeres (n=20) con lactantes sanos. Los resultados mostraron que la concentración de TNF- α fue mayor en la LM del grupo de los lactantes con fiebre en comparación con el grupo control. Lo cual respalda la naturaleza dinámica de la defensa inmunológica proporcionada por la lactancia materna en los bebés enfermos.

Freitas et al. (2019) obtuvieron resultados similares en su estudio al analizar los niveles de citocinas en LM (calostro y leche madura) de mujeres con preeclamsia y lactantes prematuros (n= 114) y controles sin preeclamsia con lactantes prematuros (n= 114). Observando una asociación entre niveles más altos de citocinas proinflamatorias (IL-1 β e IL-6) en calostro y la presencia de preeclamsia en la madre; mientras que, en la leche madura, las concentraciones de IL-6 e IL-8 fueron más bajas que las del grupo control. Para el grupo con preeclamsia, los niveles de citocinas no disminuyeron entre la transición de calostro a leche madura. Sin embargo, este cambio si sucedió en el grupo control. Los resultados obtenidos llevaron a los investigadores a la hipótesis de que en la preeclamsia las diferencias en los niveles de citocinas de la LM representan un mecanismo compensatorio activo de la glándula mamaria destinado a proporcionar protección inmunológica al neonato.

La determinación de la capacidad antioxidante total es una de las estrategias más comúnmente utilizadas para evaluar el equilibrio entre RL y antioxidantes; por

lo cual, múltiples investigaciones han descrito la determinación de este parámetro en la LM (Matos et al., 2015).

Zarban et al. (2009) utilizaron las pruebas de FRAP y DPPH en muestras de LM de mujeres con lactantes a término (n=505) que se tomaron en diferentes etapas de la lactancia: 1) 2 ± 1 día postparto (n= 115); 2) Día 7 ± 3 (n= 97); 3) Día 30 ± 3 (n= 102); 4) Día 90 ± 7 (n= 100) y 5) Día 180 ± 10 (n= 91). El objetivo de su estudio fue medir los cambios en la capacidad antioxidante total y la actividad captadora de RL en leche humana durante los primeros seis meses de vida. De acuerdo con sus resultados, estos investigadores sugieren que el consumo de calostro en los primeros días de vida es esencial debido a su alta capacidad antioxidante, la cual va disminuyendo conforme aumenta la edad del lactante. Este resultado es similar al observado por Yuksel et al. quienes también atribuyeron al calostro una alta capacidad antioxidante al medir la actividad de la SOD y CAT y observaron que estas enzimas disminuían conforme las etapas de la lactancia cambiaban.

Quiles et al. (2006) también observaron en su estudio una mayor capacidad antioxidante en el calostro al compararlo con la leche de transición y la leche madura. Ellos analizaron muestras de LM de mujeres (n= 30) con lactantes a término (n= 15) y pretérmino (n= 15) recolectadas a los 3 días (calostro), 8 días (leche de transición) y 30 días (leche madura) postparto. Sus resultados indicaron que el calostro y la leche de transición del grupo de término tuvo mayor capacidad antioxidante total que las muestras del grupo pretérmino y que la capacidad antioxidante disminuye durante las etapas de lactancia.

En otro estudio Sandal et al. (2013) determinaron el estado antioxidante y oxidante total del calostro (n= 184), pero esta vez en lactantes a término (n= 92) y lactantes pretérmino (n= 92), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de LM de ambos grupos en cuanto a la capacidad antioxidante total, el IEO y el estado oxidante total.

Estos estudios han demostrado que la capacidad antioxidante total es mayor en calostro, lo cual concuerda con la etapa de vida en la cual el lactante se encuentra más vulnerable frente a las ERO. Conforme el SI del lactante se va

especializando, el contenido de sistemas antioxidantes y como consecuencia, la capacidad antioxidante, comienzan a disminuir en la LM (Quiles et al., 2006; Zarban et al., 2009; Sandal et al., 2013; Matos et al., 2015; Yuksel et al., 2015).

Oveisi et al. (2010) compararon la capacidad antioxidante total de la LM (n= 140) y la FI (n= 80) mediante el método FRAP. Sus resultados mostraron que la capacidad antioxidante total es significativamente mayor en la LM. En otro estudio Ezaki et al. (2008) compararon la capacidad antioxidante total de LM de madres con bebés prematuros (n= 56) y FI para bebés prematuros (n= 12) utilizando la prueba del potencial antioxidante biológico. Las muestras de LM se recolectaron entre los días 4 - 145 después del parto y se observó que la capacidad antioxidante total fue más alta en la LM ($p < 0.0001$). Concluyendo en ambos estudios que la LM provee mayor capacidad antioxidante y que el uso temprano de la LM es extremadamente importante y útil en la protección del lactante contra el EO.

Tijerina-Sáenz et al. (2009) utilizaron el ensayo de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC) con el fin de medir la capacidad antioxidante total y buscar correlaciones con otros componentes de la leche humana (vitamina A, E y ácidos grasos). Ellos analizaron muestras de LM madura (n= 60) y observaron que la capacidad antioxidante de la LM se atribuía positivamente a la concentración del α -tocoferol ($p < 0.05$). Concluyendo de esta forma, que el α -tocoferol contribuye de manera importante en la estabilidad oxidativa de la leche humana.

Por su parte, Mehta et al. (2014) realizaron un estudio en LM de madres con lactantes prematuros para identificar la asociación entre la capacidad antioxidante total y las proteínas bioactivas, como: la lisozima, lactoferrina, leptina y adiponectina. Las muestras fueron otorgadas por 15 mujeres y se recolectaron en 4 tiempos diferentes: 1) día 6-8; 2) día 13-15; 3) día 20-22 y 4) día 27-29 postparto. Los resultados mostraron que las proteínas bioactivas pueden aumentar la capacidad antioxidante de la LM, lo que puede ser beneficioso para los bebés extremadamente prematuros (24-31 SDG) con alto riesgo de disfunción de mecanismos antioxidantes y patología inducida por ERO. Estas proteínas bioactivas

ausentes de las FI respaldan el uso de la LM como el alimento ideal para los neonatos tanto prematuros como a término.

Akdag et al. (2014) llevaron a cabo un estudio en donde evaluaron la capacidad antioxidante y el estado de oxidación total de muestras de LM fresca y congelada (-80 °C) de lactantes prematuros (31.2 ± 2.9 SDG). Para este estudio recolectaron muestras de calostro de 98 mujeres sanas dentro de los 4 días después del parto. Las muestras fueron divididas en dos partes, aquellas para el análisis inmediato y las muestras sometidas a congelación a -80 °C por tres meses. De acuerdo con los resultados no se encontraron diferencias significativas entre las muestras de calostro frescas y congeladas en cuanto a los parámetros medidos (capacidad antioxidante total, estado de oxidación total e IEO) ($p > 0.05$). Ellos concluyeron que el almacenamiento de la LM de lactantes prematuros a -80 °C durante tres meses conserva la capacidad antioxidante sin alterar el estado oxidativo de la leche humana.

III. JUSTIFICACIÓN

La LM cumple con un papel de protección, aparte de brindar nutrición al lactante. Por lo tanto, la leche humana, la cual contiene sustancias antiinflamatorias y antioxidantes, cumple un rol importante en la especialización del SI del lactante que lo protegerá contra afecciones a corto, mediano y largo plazo.

Esta investigación se enfocó en analizar las diferencias en la concentración (GSH) y actividad (GPx y CAT) de los sistemas antioxidantes, los marcadores de inflamación y la capacidad antioxidante total en la saliva de lactantes alimentados con LM y lactancia mixta. Estas mismas pruebas fueron realizadas también en LM; asimismo, se evaluó la capacidad antioxidante total de la FI.

Hasta el momento, no hay estudios que hablen sobre la evaluación de sistemas antioxidantes o marcadores de inflamación en muestras de lactantes (sangre o saliva) con relación al tipo de lactancia ofrecida (LME, FI o lactancia mixta). La capacidad antioxidante total se ha evaluado en los lactantes con relación al tipo de alimentación; sin embargo, estos estudios han sido realizados en sangre, lo cual expone al lactante a un mayor grado de estrés al compararlo con el muestreo en saliva.

En cuanto al análisis de muestras de LM y FI, existen estudios que realizan la comparación de la capacidad antioxidante entre estos dos tipos de leche. La cantidad de reportes en dónde se mide la concentración de citocinas en LM es menor y, si hablamos de la medición de sistemas antioxidantes, esta información es aún más limitada. Merece la pena mencionar en este contexto, que no se encontraron estudios en donde de manera simultánea se evaluaran los sistemas antioxidantes y marcadores de inflamación en LM y muestras de plasma o saliva de lactantes. Por lo cual este estudio abre una nueva ventana al conocimiento en cuanto a los niveles de sistemas antioxidantes, específicamente GSH, GPx y CAT y marcadores de inflamación (IL-1 β y TNF- α) en la saliva de lactantes de acuerdo con el tipo de lactancia ofrecida. Ello permite a la vez evaluar de manera simultánea estos mismos marcadores en muestras de LM.

HIPÓTESIS

La saliva de lactantes alimentados con leche materna presenta concentraciones menores de marcadores de inflamación y mayor actividad de sistemas antioxidantes en comparación con la saliva de los lactantes alimentados con fórmula infantil y lactancia mixta. Asimismo, la leche materna contiene marcadores de inflamación y sistemas antioxidantes y presenta mayor capacidad antioxidante total en comparación con la fórmula infantil.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IV. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar los marcadores de inflamación y sistemas antioxidantes en saliva de lactantes y leche materna.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar la concentración (GSH) y actividad (GPx y CAT) de los sistemas antioxidantes en saliva y leche materna.
2. Analizar la concentración de marcadores de inflamación (IL-1 β y TNF- α) en saliva y leche materna por medio de la prueba de ELISA.
3. Evaluar la capacidad antioxidante por medio de las pruebas DPPH y FRAP en saliva, leche materna y fórmula infantil.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

V. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio

Estudio transversal, descriptivo y comparativo.

6.2 Definición del universo

El reclutamiento y recolección de muestras de saliva y leche se llevó a cabo en el Centro de Salud Satélite de la SESEQ y Expo bebé y niños-- ediciones 24 y 25 llevadas a cabo en el centro de congresos de la ciudad de Querétaro--, tras la invitación a participar, la aceptación voluntaria y el proceso de consentimiento informado de las mujeres participantes. Todos los procedimientos se llevaron a cabo con base a los lineamientos éticos establecidos por el protocolo de Helsinki. El proyecto fue previamente aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales (no. de registro: 11675).

Los grupos comprendidos por las madres y los lactantes fueron:

- Grupo 1: Lactantes alimentados con LM de forma exclusiva.
- Grupo 2: Lactantes alimentados con FI + lactancia mixta.

Las muestras de leche se dividieron en:

- LM.
- FI.

6.3 Tamaño de la muestra

Se realizó el cálculo de tamaño de muestra por medio de la fórmula de dos medias paralelo, considerando un error alfa de 0.5 y un poder estadístico de 0.80, para detectar una diferencia de 0.25 mmol ET/L entre dos muestras con una desviación estándar de 0.25, obteniendo un tamaño de muestra de 16 individuos. Se agregó un porcentaje de pérdida del 20% obteniendo un total de 19 sujetos por grupo.

Dado que no fue posible cumplimentar el tamaño de muestra en el grupo de FI y lactancia mixta, el muestreo se realizó por simple disponibilidad. Se contó con una n= 20 sujetos para el grupo de LME, n= 5 para el grupo de lactancia mixta y n= 3 para el grupo de FI. Se decidió sumar los grupos de FI y lactancia mixta para aumentar la población (n=8) de estudio de lactantes alimentados con FI, siendo ésta la clasificación principal del estudio.

Las muestras también se analizaron a manera de prueba piloto con la distribución de los 3 grupos originalmente propuestos (LME, FI y lactancia mixta).

6.4 Criterios de selección

6.4.1 Criterios de inclusión

- Binomio madre-hijo sanos:
 - Mujeres de 19 años en adelante.
 - Lactantes de 2 a 6 meses de edad que no hubieran iniciado con la alimentación complementaria.
 - Mujeres que hayan aceptado participar en el estudio y firmaran el consentimiento informado.

6.4.2 Criterios de exclusión

Mamá

- Haber cursado su embarazo con diabetes gestacional o alguna enfermedad hipertensiva.
- Haber presentado distocia.
- En el caso de las mujeres lactantes, haber tomado medicamentos en los últimos siete días.
- Que durante el embarazo o lactancia hubiera cursado con alguna toxicomanía.
- Presentar alguna enfermedad infecciosa.

Lactante

- Que se encontrara tomado medicamento o los hubiera tomado en los últimos siete días.

- Haber sido vacunado en los últimos siete días.
- Que presente alguna enfermedad infecciosa o crónica.
- Presencia de fiebre al momento de la evaluación

6.4.3 Criterios de eliminación

- Que la madre decidiera abandonar el estudio.
- Que no se contara con la cantidad de muestra necesaria para las determinaciones.

6.5 Procedimiento de recolección de la información

6.5.1 Reclutamiento

Se realizó el cuestionario de selección (Anexo B) para determinar quiénes serían incluidos en el estudio. Una vez aprobado el cuestionario se les explicó con detalle en qué consistía el estudio y tras la aceptación a participar, se firmaba el consentimiento informado (Anexo A).

Los cuestionarios y la toma de muestras se llevaron a cabo el mismo día de reclutamiento, en un horario comprendido de 9 am a 4 pm para la población que se encontraba en el Centro de Salud Satélite, en donde se facilitó el acceso a un consultorio de manera que las mamás se sintieran cómodas durante todo el proceso. En cuanto a la población reclutada en expo bebé y niños, el horario comprendido fue de 9 am a 8 pm y se adecuó un espacio privado dentro del stand para que las mamás pudieran extraer la muestra de leche.

6.5.2 Aplicación de encuestas generales

Una vez firmado el consentimiento informado se realizaron los siguientes cuestionarios:

- a) Cuestionario del lactante (Anexo C). En donde se recolectaron datos como: tipo de parto, hospital de nacimiento del lactante, primer alimento ofrecido (leche materna o formula infantil), si la mamá recibió orientación previa sobre como brindar lactancia materna y si se había introducido algún otro tipo de

alimento a la dieta del bebé hasta el momento de la realización del cuestionario.

b) Formato socioeconómico (Anexo D).

6.5.3 Toma de medidas antropométricas del lactante

Se realizó la toma de peso, talla, circunferencia cefálica; a continuación, se especifican las técnicas realizadas:

El peso se tomó con la báscula pesabebés electrónica de fina graduación (SECA; Alemania), la cual tiene una precisión de 100g. La báscula se calibró y se colocó sobre una superficie plana; posteriormente, se retiró la ropa del lactante dejándolo únicamente con el pañal limpio, se colocó recostado sobre la bandeja de la báscula y se tomó el peso en kilogramos (CDC, 1988).

La talla de lactante se tomó con el infantómetro plegable (SECA; Alemania), el cual tiene una precisión de 1 mm. Se recostó al niño sobre el Infantómetro con ayuda de la mamá, la cual se encargó de mantener la cabeza del lactante con la porción del plano vertical de Frankfurt firme sobre la base fija del infantómetro. Posterior a esto, se colocaron cuidadosamente las piernas de lactante en posición recta y se apoyó la planta de los pies contra el área móvil del Infantómetro, registrándose la medición en centímetros (CDC, 1988).

La circunferencia cefálica se midió con una cinta antropométrica metálica (Lufkin; México). Con ayuda de la mamá se sentó al bebé sobre su regazo y se sostuvo firmemente la cinta métrica alrededor de la cabeza del lactante en la región supraciliar, considerando la parte más prominente del área frontal y protuberancia occipital. La medición se expresó en centímetros (CDC, 1988).

6.5.4 Obtención de muestras de saliva

Se obtuvieron las muestras de saliva (2 mL) mediante aspiración directa de la boca por medio de pipetas Pasteur estériles, por lo menos media hora después de haber realizado su última toma, con la finalidad de evitar la presencia de residuos de leche. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL y

se guardaron en una hielera con geles previamente congelados para mantener la temperatura de almacenamiento baja. Posteriormente, las muestras se trasladaron al laboratorio de Nutrición Humana (FCN-UAQ) campus Juriquilla, en donde se preservaron en el ultracongelador a una temperatura de -80 °C hasta el momento de su análisis.

6.5.5 Obtención de muestras de leche

Se invitó a la madre a pasar a un espacio cómodo y privado. La extracción manual de leche la realizó ella misma de acuerdo con el método señalado por la OMS, la cual comprende los siguientes pasos:

- Como primer paso la mamá se lavó las manos cuidadosamente en el lavamanos ubicado dentro del consultorio.
- La mamá procedió a tomar asiento y se le proporcionó un frasco estéril para colocar la muestra de leche.
- Se le indicó colocar el dedo pulgar sobre el pecho por encima del pezón y la areola, y el índice por debajo, opuesto al pulgar. Con los otros dedos se indicó sostener el pecho.
- Posteriormente, se le pidió que presionara el pulgar y el índice hacia la pared torácica, evitando presionar demasiado para no bloquear los conductos galactóforos.
- Se le pidió presionar el pecho entre el pulgar y el índice para presionar los senos lactíferos ubicados por debajo de la areola. Una vez realizado este paso, se pidió a la mamá hacer presión sobre el pecho y soltar en repetidas ocasiones, preguntando si se sentía alguna molestia ya que de ser así la técnica no se estaba siguiendo correctamente.
- Se indicó hacer presión a los lados de la areola para asegurar que la leche se extraía de todos los conductos, esta presión se realizó sin deslizar o frotar los dedos en la piel.
- La leche se extrajo de un solo pecho en un tiempo de 10-15 min con la intención de obtener leche temprana y leche tardía y de esta manera

asegurar una concentración más uniforme de todos los componentes, obteniendo un aproximado de 20 mL.

Para el almacenamiento de las muestras de leche se utilizó la misma metodología indicada para las muestras de saliva.

6.6 Prueba piloto

Se realizó una prueba previa en donde se obtuvo una muestra de saliva y una muestra de LM a las que se les realizaron las distintas técnicas que serían aplicadas en el estudio, para estandarizar los procedimientos, permitiendo detectar fallas o inconsistencias en el diseño de la investigación.

6.7 Variables

Variables		Tipo de variables	Unidades	Definición conceptual
General	Específica			
Edad		Cuantitativa continua	Meses	Tiempo que ha vivido una persona contando desde el nacimiento.
Tipo de alimentación	Lactancia materna	Cuantitativa nominal	1= Lactancia materna	Alimentación exclusiva con leche materna.
	Lactancia mixta		2= Lactancia mixta	Alimentación con lactancia materna y fórmula infantil.
Sistemas antioxidantes (leche materna y saliva)	Catalasa	Cuantitativa Continua	U/mg proteína	Enzima que promueve la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.
	Glutación reducido	Cuantitativa Continua	µg/mg proteína	Antioxidante que limita la actividad de los radicales superóxidos aniónico, peróxido de hidrógeno, etc.
	Glutación peroxidasa	Cuantitativa Continua	mU/mg proteína	Enzima antioxidante que actúa contra el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos orgánicos.
Capacidad antioxidante (saliva, leche materna y fórmula infantil)	FRAP	Cuantitativa Continua	% de inhibición	Capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa.
	DPPH	Cuantitativa Continua	% de inhibición	Capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa.
Determinación de citocinas	TNF- α	Cuantitativa Continua	pg/mg de proteína	Citocina proinflamatoria

proinflamatorias	IL-1 β	Cuantitativa Continua	pg/mg de proteína	Citocina proinflamatoria
	IL-6	Cuantitativa Continua	pg/mg de proteína	Citocina proinflamatoria
P/e		Cuantitativa de intervalo	Puntuación z	Refleja la masa corporal alcanzada en relación con la edad cronológica.
P/t		Cuantitativa de intervalo	Puntuación z	Refleja el peso relativo para una talla dada y define la probabilidad de la masa corporal, independientemente de la edad.
T/e		Cuantitativa de intervalo	Puntuación z	Refleja el crecimiento lineal alcanzado en relación con la edad cronológica y sus déficits.
PC/e		Cuantitativa de intervalo	Puntuación z	Medición del perímetro de la cabeza de un niño en su parte más grande, nos indica si el desarrollo se está dando de manera adecuada.
IMC actual (materno)		Cuantitativa de intervalo	kg/m ²	Resultado de la división del peso en kg entre la estatura en metros elevada al cuadrado.
IMC pregestacional		Cuantitativa de intervalo	kg/m ²	Resultado de la división del peso antes del embarazo en kg entre la estatura en metros elevada al cuadrado

6.8 Determinaciones de laboratorio

Previo a las determinaciones, todas las muestras de saliva y LM, exceptuando las muestras destinadas para el análisis de citocinas, se centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C durante 25 min, con el fin de eliminar posibles contaminantes. Se transfirió el sobrenadante a microtubos por separado con el fin de obtener alícuotas para cada ensayo y se almacenaron a -80 °C para su análisis posterior. De la misma forma, las muestras de FI se centrifugaron por duplicado siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado. En el caso de las pruebas, en las cuales se realizó alguna dilución de la muestra, se utilizó como diluyente agua destilada certificada. Todas las determinaciones se llevaron a cabo en condiciones de oscuridad debido a que la mayoría de los reactivos utilizados eran fotosensibles. Así mismo, todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

6.8.1 Cuantificación de proteína.

Para la cuantificación de proteína en saliva y LM se utilizó el kit BCA Protein Assay Kit (Pierce; Rockford, IL, EUA). Esta es una prueba colorimétrica altamente sensible en donde se hace uso del método de ácido bicinconínico (BCA por sus siglas en inglés), en el cual por acción de la proteína el ion cúprico se reduce a ion cuproso en un medio alcalino. El producto de reacción se torna de color púrpura y se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso. La coloración del producto varía de azul claro a púrpura oscuro en función a la concentración de proteína. Este cambio de coloración se mide a una absorbancia de 562 nm.

Metodología:

Se diluyó el contenido de una ampolleta de albúmina sérica bovina (BSA) a diferentes concentraciones en varios viales limpios numerados (Anexo E). Como diluyente se utilizó agua destilada de grado reactivo.

Se preparó la solución de trabajo, mezclando 50 partes del reactivo A y 1 parte de reactivo B de BCA.

Como tercer paso, se realizó la curva de calibración por duplicado, colocando en cada pocillo 50 μL de estándar y 200 μL de solución de trabajo, con un volumen total de 250 μL .

Posteriormente, se colocó la tapa a la microplaca y se cubrió con papel aluminio para introducirla al horno de aire forzado (Shel Lab; Cornelius, OR, EUA), en donde se incubó a 37 °C por 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, la microplaca se extrajo del horno de secado y se le retiró el papel aluminio y la tapa para colocarla en el espectrofotómetro UV-Vis spectraMax 250 (Molecular devices; San Diego, CA, EUA) realizando la lectura a una longitud de onda de 562 nm.

Se realizó un promedio de los duplicados y se obtuvo la ecuación lineal (ver anexo F).

Preparación de las muestras:

Las muestras de saliva y leche materna se descongelaron en refrigeración mientras se realizaba la preparación de la solución de trabajo. Una vez preparada esta solución, se procedió a exponer las muestras a temperatura ambiente para que terminaran su proceso de descongelación.

Para las muestras de saliva se utilizó un factor de dilución de 1:3, tomando con ayuda de una micropipeta BioPette (Labnet; Edison, NJ, EUA) 40 μL de saliva y 80 μL de agua destilada; mientras que, las muestras de leche materna se sometieron a una dilución de 1:200, para lo cual se tomó 1 μL de leche homogeneizada y 199 μL de agua destilada. Para ambas muestras se tomó el volumen deseado con ayuda de una micropipeta, se colocó en tubos eppendorf de 0.5 o 2 mL, dependiendo el volumen final, y posteriormente se colocó el volumen correspondiente de agua destilada certificada. Cada tubo se mezcló con ayuda del vórtex genie 2 (Daigger; Hamilton, NJ, EUA).

Preparación de la microplaca:

Para realizar la determinación de proteína en las muestras se realizó el mismo procedimiento señalado para la curva de calibración:

- Se colocaron 50 μL de muestra previamente diluida (saliva o leche materna) en la microplaca de 96 pocillos.
- Posteriormente se añadió 200 μL de solución de trabajo.
- Se colocó la tapa de la microplaca, se envolvió en papel aluminio y se introdujo en el horno de aire forzado dejándola incubar a 37° C por 30 min.
- Una vez transcurrido el tiempo de incubación se sacó la microplaca del horno, se removió el papel aluminio, se destapó e inmediatamente se colocó dentro del espectrofotómetro y se realizó la lectura a una longitud de onda de 562 nm.

- Obtenidas las absorbancias se realizó un promedio de cada duplicado y se aplicó la ecuación resultante de la curva de calibración, despejando x:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

- Después de obtener los resultados por medio de la ecuación, se multiplicaron por el factor de dilución.

6.8.2 Determinación de sistemas antioxidantes

6.8.2.1 Catalasa

El método para la determinación de CAT consiste en agregar H_2O_2 a la muestra para producir agua y oxígeno molecular. La actividad de la CAT es inversamente proporcional a la absorbancia en presencia de H_2O_2 (Aebi, 1984; Ighodaro et al., 2018).

Método:

Para llevar a cabo la medición de la actividad de la catalasa, se prepararon dos soluciones: la solución amortiguadora de fosfatos 50 mM para el cual se pesaron con ayuda de la balanza analítica (Precisa; Dietikon, Suiza) 0.27 g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) (JT Baker; Radnor, PA, EUA) y 0.53 g de fosfato monosódico (NaH_2PO_4) (JT Baker; Radnor, PA, EUA), se colocaron en un frasco de plástico transparente y se agregaron 80 mL de agua destilada certificada previamente medida con una probeta, se colocó la tapa del frasco y se mezcló con ayuda del vórtex.

La segunda solución preparada fue la solución de peróxido de hidrógeno 30 mM. La característica importante del H_2O_2 es su inestabilidad por tal motivo, el primer paso fue determinar la concentración del H_2O_2 al 30 % (Golden bell; CDMX, México) para poder realizar la solución de H_2O_2 al 30 mM.

Se adicionaron 300 μL de H_2O_2 al 30 % en la microplaca con ayuda de una micropipeta y se tomó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 250 nm, el valor obtenido se sustituyó en la siguiente ecuación:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] \text{ mM} = A_{250}/0.0436$$

Dónde:

A_{250} : es la absorbancia H_2O_2 a 250 nm.

0.0436: es el coeficiente de extinción del H_2O_2 ($\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Una vez obtenida la concentración de la solución de H_2O_2 al 30%, se procedió a preparar la solución 30 mM utilizando la siguiente ecuación:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

Dónde:

C = concentración

V = volumen

i = inicial

f = final

Preparación de las muestras:

Las muestras de saliva y leche materna se descongelaron a temperatura ambiente, posteriormente se refrigeraron mientras se realizaba la preparación del H_2O_2 al 30 mM.

Se utilizó el factor de dilución de 1:1500 para ambas muestras, tomando con ayuda de la micropipeta 1 μL de saliva o leche y 1499 μL de agua destilada, cada muestra fue etiquetada y colocada en tubos eppendorf de 2 mL.

Preparación de la microplaca:

- En una microplaca de 96 pozos se colocó en primer lugar 170 μL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM.
- Después se colocaron 30 μL de muestra.
- Por último, se colocó un volumen de 100 μL de H_2O_2 30 mM y se introdujo la microplaca en el espectrofotómetro.
- Previo a tomar las lecturas correspondientes, se mezcló la microplaca con ayuda del espectrofotómetro durante 30 segundos, para homogeneizar la solución.

- Se tomaron lecturas continuas de las muestras a una longitud de onda de 250 nm durante un tiempo de 2 min para evaluar el cambio de actividad de la catalasa.
- Una vez obtenidas las absorbancias se realizó un promedio de los duplicados de cada muestra y se aplicó la siguiente fórmula a cada resultado:

$$[\textit{Actividad CAT}] = \frac{(\Delta\textit{abs/min})(V_t)(FD)}{(V_m)(t)(0.0436)}$$

Dónde:

V_t = volumen total en el pozo (300 μL)

V_m = volumen de la muestra (30 μL)

t = tiempo de lectura en minutos (2 min)

FD = factor de dilución

0.436 coeficiente de extinción del H_2O_2

*Los resultados se expresaron en U/mg de proteína.

6.8.2.2 Glutación reducido

El principio de la técnica se basa en la reacción de GSH con DTNB. El GSH reacciona con DTNB para formar TNB y GS-TNB. El TNB formado es dependiente de la cantidad de GSH contenido en el medio y se puede cuantificar a una longitud de onda de 412 nm (Rahman et al., 2007).

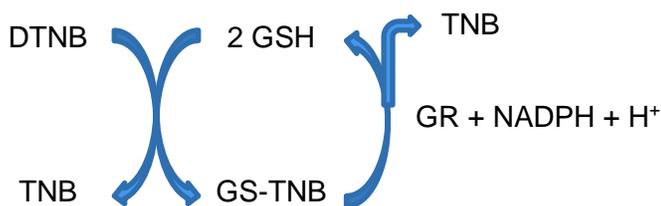


Figura 4. Reciclaje enzimático de GSH.

Adaptada de Rahman et al. (2007).

Método:

Se realizó la preparación de las soluciones requeridas. Para la solución amortiguadora Tris/EDTA (Tris 0.2 M, EDTA 0.02 M; pH= 8.2) se pesaron con ayuda de la balanza analítica: 2.101 g de Tris-HCl (Sigma; St. Louis, MO, EUA) y 0.496 g de EDTA (JT Baker; Radnor, PA, EUA), los cuales se colocaron en un frasco de plástico transparente debidamente etiquetado. Posteriormente, con ayuda de una probeta se midieron 100 mL de agua destilada y se vertieron al frasco, se colocó la tapa y se mezcló con ayuda del vórtex. Una vez preparada la solución se almacenó a 4 °C, teniendo una vida media de 3 meses.

La solución madre de GSH 0.6 mM se preparó pesando con la balanza analítica: 0.00184 g de GSH (Sigma; St. Louis, MO, EUA) y se colocó en un frasco de vidrio oscuro etiquetado. Se añadieron con ayuda de una probeta, 10 mL de solución amortiguadora Tris/EDTA, se tapó y se mezcló en el vórtex, posteriormente se refrigeró. Esta solución debe prepararse el mismo día en el que se utiliza.

Por último, se preparó la solución DTNB 2.46 mM pesando en la balanza analítica 0.0243 g de DTNB (Sigma; St. Louis, MO, EUA), los cuales se colocaron en un frasco de vidrio oscuro para añadirle 25 mL de metanol con ayuda de una probeta graduada, una vez vertido el metanol se tapó el frasco y se mezcló en el vórtex. Esta solución debe prepararse el mismo día en el que se utiliza.

Se realizó la curva estándar de calibración de GSH por duplicado con ayuda de la tabla 8 (Anexo E). Los reactivos se colocaron en la microplaca de 96 pozos en el siguiente orden: Primero se agregaron con ayuda de la micropipeta 100 μ L de solución amortiguadora en cada uno de los pozos designados para la curva en segundo lugar, se agregó la solución madre de GSH teniendo cuidado de colocar el volumen indicado en la tabla 2 para cada uno de los pozos; posteriormente, se colocó el metanol, siguiendo los volúmenes indicados en la tabla y finalmente se agregaron 80 μ L de DTNB.

Una vez lista la microplaca se colocó dentro del espectrofotómetro y se agitó suavemente durante 30 s, se dejó reposar por un tiempo de 5 min y se tomó la lectura a una longitud de onda de 412 nm.

Se realizó un promedio de los duplicados y se obtuvo la ecuación lineal (Anexo F).

Preparación de la muestra:

Para realizar la determinación de GSH en las muestras de saliva y LM se llevó a cabo la precipitación de proteína por medio del ácido tricloroacético (TCA por sus siglas en inglés) con un grado de pureza del 99% (Sigma; St. Louis, MO, EUA). Como primer paso se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, mientras se realizaban las diluciones del TCA para llevarlo a una concentración del 5 y 25% utilizando la fórmula $C_i V_i = C_f V_f$.

El siguiente paso consistió en colocar con ayuda de la micropipeta, 115 μ L de muestra en tubos eppendorf de 2 mL, a estos mismos tubos se les agregaron 28.8 μ L de TCA al 25 %, se mezclaron con ayuda del vórtex y se refrigeraron por 5 minutos. Pasados los 5 min se sacaron del refrigerador y se les agregó 138 μ L de TCA al 5% e inmediatamente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se separó el sobrenadante con ayuda de la micropipeta y se colocó en tubos eppendorf de 2 mL.

Preparación de la microplaca:

Para la determinación de GSH en las muestras se utilizaron las soluciones previamente preparadas para la curva de calibración: solución amortiguadora Tris/EDTA, metanol y solución de DTNB 2.46 mM.

Las soluciones se agregaron en la microplaca con ayuda de una micropipeta en el siguiente orden:

- Se agregaron 100 μ L de solución amortiguadora Tris/EDTA en cada pozo con ayuda de una micropipeta.

- En segundo lugar, se agregaron 70 μL de cada muestra, ya fuera leche o saliva, por duplicado.
- Una vez agregadas las muestras se añadieron 50 μL de metanol.
- La última solución en agregarse fue el DTNB, del cual se ocuparon 80 μL .
- El siguiente paso fue colocar la placa dentro del espectrofotómetro y agitar durante un lapso de 30 segundos, posteriormente se dejó reposar la microplaca 5 min y cumplido este tiempo se leyó a una longitud de onda de 412 nm.
- Una vez obtenidas las absorbancias se promedió cada duplicado y se aplicó la ecuación resultante de la curva de calibración, despejando x:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

- Los resultados se expresaron en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína.

6.8.2.3 Glutación peroxidasa

La medición de la actividad oxidativa de la GPx se realizó de una manera indirecta, es decir, se midió el NADP⁺ el cual es el producto formado por la glutación reductasa (GR), enzima que también participa en la reacción.

En el primer paso la GPx cataliza la reacción del hidroperóxido de cumeno y GSH provocado la oxidación del GSH, estabilizando al hidroperóxido y liberando agua.



El glutación oxidado (GSSG) producido en la reacción anterior es reducido en la reacción catalizada por la GR en presencia del cofactor NADPH + H⁺.



La oxidación de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a NADP^+ puede ser determinada por la disminución de la absorbancia a 340 nm, lo cual es directamente proporcional a la actividad de la GPx presente en la muestra y al aumento o disminución del estrés oxidativo (Cayman, 703102).

Método:

Para la medición de la actividad de la GPx se prepararon los siguientes reactivos: Solución amortiguadora de reacción Tris-HCl (50 mM, EDTA 0.5 mM; pH 8), para la cual se pesaron con ayuda de la balanza analítica: 0.788 g de Tris-HCl y 0.0186 g de EDTA, posteriormente se colocaron en un frasco transparente de plástico y con ayuda de una probeta se agregaron 80 mL de agua destilada, se colocó la tapa y se mezcló en el vórtex. Por último, se refrigeró a 4 °C. Esta solución tiene una vida media de 3 meses.

La solución cóctel de GSH/GR (GSH 25.2 mM, 6 unidades de GR/mL) se preparó con la mezcla de las soluciones A y B, para las cuales se siguieron los siguientes pasos: para la solución A; se pesaron 0.0774g de GSH en la balanza analítica. Este reactivo, una vez pesado se colocó en un frasco oscuro y se le agregaron 10 mL de solución amortiguadora de reacción Tris/EDTA, se mezcló en el vórtex y se reservó en refrigeración a una temperatura de 4 °C. Para la solución B se tomaron con ayuda de una micropipeta; 934 μL de solución amortiguadora de reacción Tris/EDTA y se colocaron en un frasco oscuro, ahí mismo se añadieron 66 μL de GR (Sigma; St. Louis, MO, EUA). Estas soluciones deben guardarse por separado en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su uso, debido a que tienen baja estabilidad.

Para preparar el cóctel se mezclaron partes iguales de la solución A y la solución B tomando en cuenta que para cada pozo se requerirán 25 μL de solución A y 25 μL de solución B ocupando un volumen total de 50 μL de cóctel por pozo. La estabilidad de esta solución es de 2 h a una temperatura de 4°C.

La solución madre de NADPH 5mM se preparó pesando 0.0042 g de NADPH (Sigma; St. Louis, MO, EUA), el cual se colocó en un tubo eppendorf de

2 mL envuelto en papel aluminio para protegerlo de la luz y se le agregó 1 mL de Tris-EDTA, se mezcló en el vórtex y se refrigeró a 4 °C hasta el momento de su uso. Esta solución tiene una estabilidad de 5 días.

La solución NADPH 1.5 mM se preparó tomando 15 μ L de solución madre NADPH 5 mM, el cual se colocó en un tubo eppendorf de 500 μ L cubierto con papel aluminio para protegerlo de la luz y se le añadieron 35 μ L de solución amortiguadora Tris/EDTA.

Para la solución de hidroperóxido de cumeno se tomaron 10 mL de agua destilada con ayuda de una probeta, se colocó en un frasco y se le añadieron 5.55 μ L de hidroperóxido de cumeno al 80 % (Sigma; St. Louis, MO, EUA).

Preparación de las muestras:

Las muestras de saliva y leche materna se descongelaron en refrigeración mientras se preparaban las demás soluciones. Ya descongeladas tanto las muestras de saliva como las de leche materna se diluyeron con agua destilada, usando un factor de dilución de 1:200.

Preparación de la microplaca:

Para la determinación de la actividad de la GPx se agregaron las soluciones en la microplaca con ayuda de las micropipetas, realizando el cambio de punta entre reactivos y muestras. El orden seguido para colocar las soluciones fue el siguiente:

- Se agregaron 100 μ L de solución amortiguadora Tris/EDTA en cada pozo.
- Posteriormente se añadieron 50 μ L de cóctel GSH/GR tratando de no tocar el fondo del pozo ni los laterales con la punta de la micropipeta.
- En tercer lugar, se agregaron 50 μ L de solución amortiguadora por duplicado para el blanco y en el caso de las muestras se añadieron 50 μ L de saliva o leche.
- El siguiente paso fue añadir 50 μ L de NADPH 1.5 mM.

- Posteriormente se agregaron 50 μL de hidroperóxido de cumeno 3 mM.
- Se colocó la microplaca dentro del espectrofotómetro, se agitó durante 30 segundos leyéndose a una longitud de onda de 340 nm realizando 8 lecturas en un tiempo de 2 min.
- Una vez obtenidas las absorbancias se realizó un promedio de cada duplicado, se restó el valor del blanco y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\Delta A_{340}/\text{min} = \frac{|A_{340}(\text{Tiempo } 2) - A_{340}(\text{Tiempo } 1)(FD)|}{\text{Tiempo } 2 (\text{min}) - \text{Tiempo } 1 (\text{min})}$$

Dónde:

$\Delta A_{340}/\text{min}$ = cambio de la absorbancia por minuto

A_{340} (tiempo x) = absorbancia medida

FD = factor de dilución

Tiempo x = tiempo en el que se tomaron las absorbancias expresado en minutos.

Los resultados de la actividad se expresan en nmol/min/mL

- Obtenidos los resultados se dividieron entre 1,000 para convertir los nmol a μmol y tomando en cuenta que 1 unidad de actividad de GPx se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de NADPH por minuto, se presentaron en U/mL.
- Por último, los resultados se dividieron entre los mg de proteína totales de cada muestra, quedando representados como: U/mg de proteína.

6.8.3 Determinación de citocinas proinflamatorias

6.8.3.1 TNF- α Humano.

La determinación del TNF- α se llevó a cabo con el Kit ELISA (Cayman; Ann Arbor, MI, EUA). El ensayo está basado en una técnica de sándwich de doble anticuerpo. Los pocillos de la microplaca están recubiertos de un anticuerpo monoclonal específico para TNF- α , el cual unirá cualquier TNF- α introducido en el pocillo. También cuenta con una acetilcolinesterasa (Fab

conjugada), que se une selectivamente a un epítipo diferente en la citocina. Cuando se agrega la citocina al pocillo, los dos anticuerpos forman un sándwich al unirse a los lados opuestos del TNF- α ; este complejo se inmoviliza en la placa para que el exceso de reactivo pueda eliminarse por medio de lavados. La concentración del analito se determina midiendo la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa Fab al agregar el reactivo de Ellman. El producto de la reacción catalizada por la acetilcolinesterasa se torna de color amarillo, el cual se mide a una absorbancia de 420 nm.

Método:

Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución amortiguadora ELISA 1x para el cual se midieron 90 mL de agua destilada con una probeta, los cuales se colocaron en un frasco de plástico transparente y se añadió 1 vial de ELISA solución amortiguadora concentrada 10x. Se mezcló con ayuda del vórtex y se refrigeró a 4 °C.

Para la solución amortiguadora de lavado 1x se midieron 500 mL de agua destilada con ayuda de un matraz aforado y se vertieron en un vaso de precipitados, se le agregaron 1.25 mL de “wash buffer concentrate” 400 x y 250 μ L de polisorbato 20, se mezcló suavemente con ayuda de una espátula y se reservó a 4 °C.

La solución blanco (SMB) se preparó añadiendo 5 mL de agua destilada a un frasco de plástico y 1 vial de SMB, posteriormente se mezcló y se refrigeró a 4 °C.

El estándar TNF- α (5 ng/mL) se preparó adicionando 2 mL de solución amortiguadora ELISA 1x en el vial de TNF- α ELISA standard, se mezcló en el vórtex y se almacenó a 4 °C.

Para preparar el conjugado TNF- α ACHE-Fab, se reconstituyó el vial de 100 dtn Fab conjugate con 10 mL de solución amortiguadora ELISA.

Para la curva de calibración se emplearon 8 tubos eppendorf de 2 mL numerados del 1 al 8:

- Tubo 1: se adicionaron 950 μ L de solución blanco.
- Tubos 2-8: Se adicionaron 500 μ L de solución blanco.
- Tubo 1: se añadieron 50 μ L de solución estándar TNF- α (5 ng/mL).
- Se tomaron 500 μ L del tubo 1 y se adicionaron al tubo 2.
- Se tomaron 500 μ L del tubo 2 y se adicionaron al tubo 3, se repitieron estos pasos hasta llegar al tubo 7.
- Se agregó a cada tubo 25 μ L de suero inespecífico de ratón. En la tabla 9 (Anexo E) se muestra la metodología para la preparación de los estándares.
- Realizadas las diluciones se tomaron 100 μ L de cada vial comenzando por el tubo 8 y se colocaron en la microplaca, se usó la misma punta de la micropipeta para montar toda la curva, la cual se realizó por duplicado.
- Posteriormente se agregaron 100 μ L del conjugado de TNF- α ACHE-Fab a cada pozo excepto a los pozos del blanco.
- Realizadas las diluciones se tomaron 100 μ L de cada vial comenzando por el tubo 8 y se colocaron en la microplaca, se usó la misma punta de la micropipeta para montar toda la curva, la cual se realizó por duplicado.
- Posteriormente se agregaron 100 μ L del conjugado de TNF- α ACHE-Fab a cada pozo excepto a los pozos del blanco.
- Se cubrió la microplaca con la película plástica transparente, se envolvió en papel aluminio y se incubó toda la noche a 4 °C.
- Al día siguiente se reconstituyó el reactivo de Ellman. Este reactivo se debe justo antes de su uso de la siguiente forma: se tomó un vial de reactivo de Ellman y se le agregaron 20 mL de agua destilada, se mezcló en el vórtex y se reservó a 4 °C hasta su uso.
- Se sacó la microplaca del refrigerador, se removió el papel aluminio y la película plástica.

- El siguiente paso consistió en realizar los lavados de la microplaca: se volteó la microplaca en un solo movimiento, sin agitarla, para remover los reactivos y se volvió a colocar hacia arriba y se agregó solución amortiguadora de lavado con ayuda de una pipeta Pasteur. Una vez cubiertos todos los pozos se repitió este paso: se volteó la placa con un solo movimiento, sin agitarla, se volvió a colocar hacia arriba, se agregó solución amortiguadora de lavado a todos los pozos y se volvió a voltear. Este paso se repitió hasta contar un total de 5 lavados.
- En el último lavado se colocó sobre una superficie plana una cama de sanitas y se golpeó suavemente la placa para quitar el exceso de solución amortiguadora de lavado.
- Después se agregaron 200 μ L de reactivo de Ellman a cada pozo.
- Se colocó la microplaca dentro del espectrofotómetro para mantener las condiciones de oscuridad y se agitó manualmente durante todo el tiempo de incubación, el cual fue de 60 min.
- Transcurridos los 60 min se tomó la lectura a una longitud de onda de 420 nm.
- Se graficaron los resultados y se obtuvo la ecuación correspondiente (Anexo F).

Preparación de muestras:

Las muestras de saliva y leche se descongelaron a temperatura ambiente; una vez descongeladas, las muestras de saliva fueron centrifugadas a 5000 rpm a 4 °C durante 25 min. Se separó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y se hicieron alícuotas de 300 μ L en tubos eppendorf de 600 μ L para la determinación de las citocinas: TNF- α e IL-1 β .

Las muestras de leche se centrifugaron en dos ocasiones de acuerdo con la metodología descrita por Soto-Ramírez et al. (2016), a 2900 rpm por 11 min a 4 °C en ambas ocasiones. Se separó el sobrenadante con ayuda de una

micropipeta y se colocó un volumen de 300 μL en tubos eppendorf de 600 μL para la determinación de las citocinas estudiadas.

No se realizaron diluciones en ninguna de las muestras analizadas. Las alícuotas destinadas para el Kit de ELISA de IL-1 β se almacenaron a -80 $^{\circ}\text{C}$.

Preparación de la microplaca:

Para realizar la determinación del TNF- α se siguieron los pasos a continuación descritos:

- Se adicionaron a cada pozo 100 μL de muestra por duplicado con ayuda de una micropipeta.
- Después se adicionaron 100 μL de conjugado TNF- α ACHE-Fab (sin adicionar al blanco).
- Se colocó la película plástica sobre la microplaca, se envolvió en papel aluminio para proteger de la luz y se incubó toda la noche en refrigeración a una temperatura de 4 $^{\circ}\text{C}$.
- Al día siguiente se preparó el reactivo de Ellman inmediatamente antes de su uso, de acuerdo con la metodología anteriormente descrita en el apartado de curva de calibración.
- Se sacó la microplaca del refrigerador y se removió el papel aluminio y la película plástica.
- De un solo movimiento se volteó la microplaca, sin agitarla, para retirar el exceso de reactivos e inmediatamente se volvió a colocar hacia arriba.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur se colocó a cada pozo solución amortiguadora de lavado, una vez cubiertos todos los pozos se volteó la microplaca sin agitarla y se volvió a colocar hacia arriba, se repitió el paso anterior hasta contar un total de 5 lavados.
- Al voltear la microplaca por última vez se golpeó de manera suave contra papel absorbente para eliminar los residuos de solución amortiguadora.
- Se adicionó a todos los pozos 200 μL de reactivo de Ellman.

- Se colocó la placa en el espectrofotómetro para mantener las condiciones de oscuridad y se agitó de manera manual por 60 min.
- Transcurrido el tiempo de incubación se leyó la placa a una longitud de onda de 420 nm.
- Obtenidas las absorbancias se realizó un promedio de cada duplicado y se aplicó la ecuación resultante de la curva de calibración despejando x:

$$x \text{ (pg/mL)} = \frac{y - b}{m}$$

- El valor obtenido representa el resultado en pg/mL por lo cual se dividió entre los mg de proteína presentes en cada muestra para representar los resultados en pg/mg de proteína.

6.8.3.2 IL-1 β humano.

La determinación de la IL-1 β se llevó a cabo con el Kit ELISA (Cayman; Ann Arbor, MI, EUA). El ensayo está basado en una técnica de sándwich de doble anticuerpo, similar al descrito para TNF- α .

Método:

Se utilizó la misma metodología descrita para el TNF- α .

6.8.4 Pruebas de capacidad antioxidante

6.8.4.1 FRAP

El método FRAP para la determinación de capacidad antioxidante en saliva, leche materna y fórmula infantil se realizó de acuerdo con la técnica propuesta por Firuzi et al. (2005). Esta técnica tiene como principio la transferencia de electrones en la solución férrica por medio de un antioxidante para formar un compuesto ferroso; desarrollándose un color azul cuya intensidad va en proporción a la capacidad antioxidante de la muestra, el aumento en la absorbancia se mida a una longitud de onda de 595 nm (Benzie & Strain, 1996).

Para el reactivo de FRAP se prepararon las siguientes soluciones:

Solución amortiguadora de acetato, para el cual se pesaron en la balanza analítica 0.31 g de acetato de sodio (Golden bell; CDMX, México) y se agregaron en un frasco transparente, se vertieron en el mismo frasco 100 mL de agua destilada y con ayuda de una micropipeta se añadieron 1.6 mL de ácido acético (Fluka; Charlotte, NC, EUA). Se reservó a 4 °C.

La solución 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) se preparó agregando con ayuda de un matraz aforado 50 mL de agua destilada en un frasco de plástico, posteriormente se agregaron 165 μ L de ácido clorhídrico (Productos Químicos Monterrey; Monterrey, NL, México), se tomaron 25 mL de esta solución con ayuda de un matraz aforado y se colocaron en otro frasco debidamente etiquetado. Posteriormente, se agregaron 0.78 g de TPTZ (SIGMA; St. Louis, MO, EUA) se tapó el frasco y se mezcló en el vórtex.

Para la preparación del cloruro de hierro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) se midieron 10 mL de agua destilada y se colocaron en un frasco de plástico agregando después 0.088 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (High Purity; Charleston, SC, EUA) el cual se mezcló en el vórtex.

Finalmente, el reactivo FRAP se preparó añadiendo en un frasco de vidrio oscuro 25 mL de solución amortiguadora de acetato, 2.5 mL de solución TPTZ y 2.5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

También se prepararon las soluciones madre de ácido ascórbico para la realización de la curva de calibración. El stock de ácido ascórbico de 60 mg/mL se preparó añadiendo 0.06 g de ácido ascórbico, los cuales se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL cubierto con aluminio, para diluirlo se añadió 1 mL de agua destilada y se mezcló en el vórtex.

La solución madre de ácido ascórbico 0.001 M se preparó tomando 29 μ L de solución madre 60 mg/mL, los cuales se diluyeron en 971 μ L de agua destilada.

Finalmente, la solución madre de ácido ascórbico 170 μ g/mL se preparó tomando 96 μ L de stock 0.001 M el cual se diluyó en 904 μ L de agua destilada.

En la tabla 10 (Anexo E) se muestra la curva de calibración de la prueba de FRAP. Los reactivos se colocaron en la microplaca en el siguiente orden: primero se agregó el agua destilada de acuerdo con el volumen indicado en la tabla 7; en segundo lugar, se añadió la solución stock de 170 $\mu\text{g/mL}$ y por último se agregó el reactivo FRAP.

Se tapó la microplaca y se cubrió con papel aluminio para protegerla de la luz, inmediatamente se introdujo en el horno de aire forzado a una temperatura de 37 °C durante 4 min para favorecer la reacción entre los compuestos. Trascurrido el tiempo se extrajo la microplaca del horno y se destapó con cuidado para introducirla en el espectrofotómetro, se agitó durante un lapso de 30 s y se leyó a una longitud de onda de 595 nm. Se realizó un promedio de las absorbancias obtenidas por duplicado y se calculó la ecuación lineal (Anexo F).

Preparación de muestras:

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, una vez descongeladas se realizaron diluciones de la LM y la FI utilizando un factor de dilución de 1:10 para ambas muestras. Las muestras de saliva no se diluyeron.

Preparación de microplaca:

- Con una micropipeta se tomaron 60 μL de muestra y se añadieron en la placa por duplicado. Para los blancos se agregaron 60 μL de agua destilada.
- El siguiente paso fue agregar 240 μL de FRAP en cada uno de los pozos.
- Se cubrió la placa con su tapa y se envolvió en papel aluminio para protegerla de la luz, posteriormente se colocó dentro del horno de aire forzado para incubarla por 4 min a 37 °C, con la finalidad de favorecer la reacción química entre los compuestos.
- Pasados los 4 min se sacó la placa del horno, se destapó y se colocó en el espectrofotómetro, se agitó durante 30 s y se tomó la lectura a una longitud de onda de 595 nm.

- Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición (% de inhibición), de acuerdo con la fórmula presentada por Haida et al. (2019):

$$\% \text{ de inhibición} = [(A_{595} \text{ muestra} - A_{595} \text{ control}) / A_{595} \text{ muestra}] \times 100$$

Dónde:

A_{595} muestra= absorbancia de la muestra

A_{595} control= absorbancia del control

6.8.4.2 DPPH

El ensayo de DPPH se basa en el seguimiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) en un medio preparado con metanol. El monitoreo en el cambio de concentración del DPPH durante la reacción se mide a través de la disminución de la absorbancia a una longitud de onda de 520 nm. El cambio de coloración en esta solución se da de un tono violeta a un tono amarillo (Brand-Williams et al. 1995).

Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución DPPH 150 mM: para esta solución se pesaron 0.033 g de DPPH (SIGMA; St. Louis, MO, EUA) en la balanza analítica, se colocó el reactivo en un frasco de vidrio oscuro y se le agregaron 50 mL de metanol al 80 %.

Se prepararon las siguientes soluciones madre de ácido ascórbico:

La solución madre de ácido ascórbico de 1000 µg/mL se preparó añadiendo 0.005 g de ácido ascórbico en un frasco transparente cubierto con aluminio para protegerlo de la luz y se le agregaron 5 mL de agua destilada.

Se preparó la solución madre de 100 µg/mL tomando con una micropipeta 100 µL de solución madre de 1000 µg/mL, los cuales se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL previamente cubierto con papel aluminio y se le añadieron 900 µL de agua destilada.

Por último, se preparó la solución madre de 500 µg/mL tomando 500 µL de solución madre 1000 µg/mL y agregando 500 µL de agua destilada.

Para la realización de la curva de calibración se siguió la metodología mostrada en la tabla 11 (Anexo E) en donde primero se agregó el agua destilada, después se agregó el stock de 100 µg/mL en los primeros 4 puntos de la curva y para los últimos 2 puntos se utilizó el stock de 500 µg/mL. Por último, se agregó el DPPH en todos los pozos.

La microplaca se colocó en el espectrofotómetro y se agitó durante 30 s. La lectura se tomó a una longitud de onda de 520 nm. Realizadas las lecturas se calculó el promedio de los duplicados y se graficó para obtener la ecuación correspondiente (Anexo F).

Preparación de muestras:

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Las muestras de saliva no se diluyeron mientras que a las muestras de LM y FI se les aplicó un factor de dilución de 1:20, la dilución se realizó con agua destilada.

Preparación de microplaca:

Para la determinación de la capacidad antioxidante por medio de la prueba de DPPH se siguieron los pasos a continuación descritos:

- Se agregaron 20 µL de cada muestra por duplicado, para los blancos se agregó el mismo volumen de agua destilada.
- Después se añadieron 280 µL de DPPH.
- Se introdujo la placa en el espectrómetro y se agitó durante 30 s.
- La lectura de las muestras se tomó a una longitud de onda de 520 nm.
- Posteriormente se realizó un promedio de cada duplicado y se aplicó la siguiente ecuación presentada por Haida & Hakiman, (2019):

$$\% \text{ de inhibición} = [(A_{520} \text{ control} - A_{520} \text{ muestra}) / A_{520} \text{ control}] \times 100$$

- Los resultados se expresaron como % de inhibición.

6.9 Lineamientos éticos

El presente proyecto fue revisado y aprobado por el comité interno de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales (no. de registro 11675) y por el comité de Bioética de la Secretaría de Salud del estado de Querétaro (no. de registro 1069/22-02-2019/FACULTAD DE NUTRICIÓN UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO). Se firmó un consentimiento informado por los participantes.

6.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se ejecutó con el programa SPSS versión 23 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Il, USA). Se utilizó estadística descriptiva para expresar los resultados de las variables analizadas. Se realizó el análisis de normalidad en las variables con la prueba Shapiro-Wilk. Se utilizaron las pruebas de ANOVA y t-Student para las variables paramétricas; se aplicaron las pruebas de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney para variables no paramétricas. Se realizaron pruebas de correlación entre las variables, en donde se utilizó la prueba de Pearson para las variables paramétricas y la prueba Rho de Spearman para las no paramétricas. Se utilizó un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significación ($p < 0.05$).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Características generales de la población

Se incluyeron dos grupos de lactantes de acuerdo con el tipo de lactancia recibida: LM (n=20) y FI + lactancia mixta (n=8). También se analizaron muestras de LM (n=20) y FI (n=8). Los lactantes cumplieron con los siguientes criterios: lactantes nacidos a término (≥ 38 SDG), edad de 3 a 6 meses; alimentados únicamente con LM o FI; sin presencia de enfermedades crónicas o infecciosas al momento del estudio; en caso de haber pasado por un proceso infeccioso haber cumplido un mínimo de 7 días sin sintomatología y sin administración de fármacos. También se evaluó la temperatura corporal para descartar procesos infecciosos no identificables a simple vista.

La edad media de los lactantes para cada grupo fue de 3 meses. La **Tabla 1** muestra las características generales de la población de estudio. Los indicadores antropométricos se evaluaron en puntaje z utilizando las tablas de evaluación de crecimiento de la OMS. La media de los lactantes de ambos grupos de estudio mostró una ganancia de peso adecuada de acuerdo con el peso para la talla (P/T) y peso para la edad (P/E). La talla para la edad (T/E) resultó adecuada en el grupo de LM; sin embargo, el grupo de FI + mixta mostró una T/E con tendencia a la baja, sin representar esto un diagnóstico de desnutrición y sin ser un resultado que representara una diferencia significativa entre ambos grupos. Los resultados de perímetro cefálico para la edad (PC/E) señalaron un desarrollo neurológico adecuado en ambos grupos poblacionales.

La media de la edad materna fue menor en el grupo de LM (27 ± 1.2 años) en comparación con el grupo de FI + mixta (31.4 ± 1.1 años), presentando una diferencia estadísticamente significativa al comparar ambos grupos ($p=0.046$). Para el índice de masa corporal (IMC) pregestacional, la media de mamás en los dos grupos poblacionales se ubicó dentro de parámetros adecuados. Sin embargo, cabe mencionar que en las mamás del grupo de FI + mixta el IMC pregestacional mostró una tendencia al sobrepeso. La media de la ganancia de peso gestacional fue

similar para ambos grupos y, en cuanto al IMC calculado al momento de la realización de los cuestionarios, se observó que la media de las mamás del grupo que brindaba lactancia materna se mantenía dentro de los rangos considerados adecuados; mientras que, la media de las mamás que brindaban FI + mixta tuvieron un IMC dentro de los rangos de sobrepeso. Esto puede ser debido a que la lactancia materna favorece la pérdida de peso y la recuperación post-parto.

Tabla 1. Características generales de la población de estudio.

	LM n=20	FI + Mixta n=8	p
Características del lactante			
Sexo [M/F (%)] †	50/50	37.5/62.5	0.686
SDG	38.93 ± 0.23	38.25 ± 0.37	0.122
Vía de nacimiento [P/C (%)] †	65/35	25/75	0.096
APGAR (min.-máx.)	9 (8-10)	9 (8-9)	0.504
Edad lactante (meses)	3.9 ± 0.2	3.6 ± 0.4	0.611
P/T (puntaje z)	0.63 ± 0.20	0.28 ± 0.28	0.347
P/E (puntaje z)	0.15 ± 0.21	-0.41 ± 0.38	0.179
T/E (puntaje z)	-0.42 ± 0.19	-0.76 ± 0.43	0.412
PC/E (puntaje z)	-0.55 ± 0.18	-0.49 ± 0.35	0.854
Temperatura (°C)	36.3 ± 0.1	36.7 ± 0.2	0.141
Características maternas			
Edad materna (años)	27.0 ± 1.2	31.4 ± 1.1	0.046*
IMC actual (kg/m²)	24.0 ± 0.9	26.8 ± 1.1	0.088
IMC pregestacional (kg/m²)	23.5 ± 0.9	24.9 ± 0.9	0.377
Ganancia de peso gestacional (kg)	9.8 ± 0.9	9.8 ± 1.9	0.994
Embarazos totales (min.-máx.)	2 (1-5)	2 (1-4)	0.708

M, masculino; F, femenino; P, parto; C, cesárea, min., mínimo; máx., máximo.

Los datos están representados como media ± error estándar de la media.

Prueba t-Student

†Prueba chi cuadrado

Prueba bilateral *p < 0.05.

7.2 Análisis en saliva de lactantes

Se llevaron a cabo pruebas de sistemas antioxidantes, marcadores de inflamación y capacidad antioxidante en las muestras de saliva y se separaron los grupos de acuerdo con el tipo de alimentación. Los resultados representados en la **Tabla 2** se indican de acuerdo con la división en 2 grupos: LM y FI + mixta. En la **Tabla 3** se muestran los resultados de acuerdo con la división original en 3 grupos: LM, FI y lactancia mixta.

7.2.1 Sistemas antioxidantes

En relación con los sistemas antioxidantes, la concentración de GSH fue mayor en la saliva del grupo FI + mixta en comparación con la concentración medida en la saliva de los lactantes alimentados con LM ($p = 0.002$). La saliva del grupo de FI + mixta mostró, de igual manera, mayor actividad de CAT y GPx en comparación con la actividad enzimática observada en el grupo de lactantes alimentados con LM, con una diferencia significativa en el caso de GPx ($p = 0.005$). Para el caso de CAT, el valor fue de $p = 0.062$. La **Figura 5** muestra las gráficas de cajas para los sistemas antioxidantes medidos en saliva de lactantes.

La concentración mayor de GSH y la actividad aumentada de GPx en el grupo de FI, podría deberse a un mecanismo compensatorio secundario a una mayor defensa para evitar condiciones de ERO o una elevación no deseable de agentes oxidantes. La GPx es la primera enzima en activarse frente a una elevación de ERO requiriendo GSH como sustrato. La CAT aumenta su actividad únicamente cuando la producción de ERO sobrepasa la actividad de la GPx. Esto podría explicar la razón por la cual la CAT no presenta una diferencia significativa en su actividad en este estudio.

De hecho, aunque hay pocos estudios en lactantes, existen algunos estudios en niños y adultos que indican que una mayor concentración o actividad de sistemas antioxidantes puede ser indicativo de una alta demanda de sistemas de defensa originada por alteraciones metabólicas que ponen en riesgo la homeostasis del organismo.

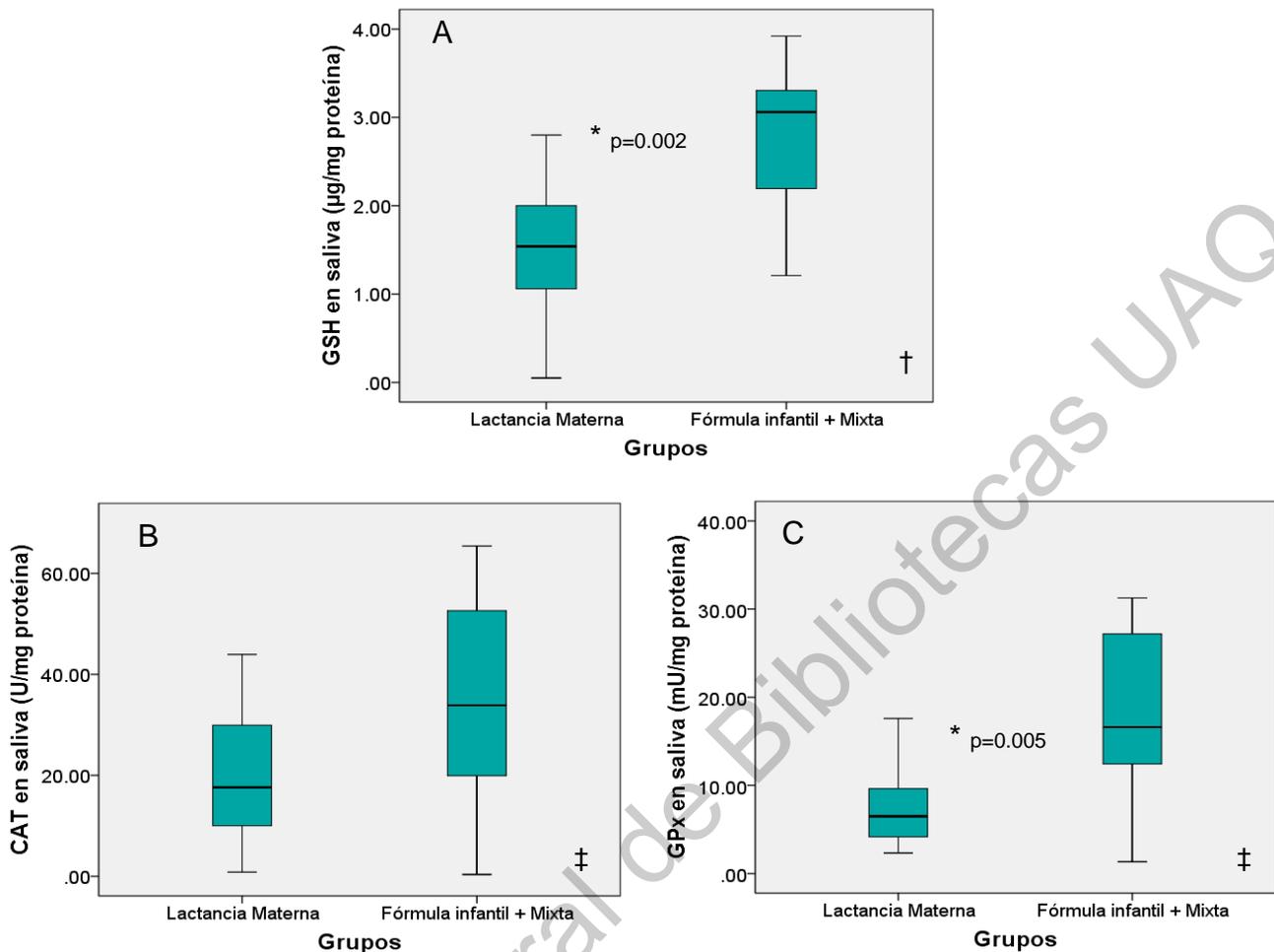


Figura 5. Sistemas antioxidantes medidos en saliva de lactantes.

(A) Concentración de GSH ($p=0.002$). (B) Actividad enzimática de CAT. (C) Actividad enzimática de GPx ($p=0.005$). †Prueba t-student. ‡Prueba U Mann-Whitney. Prueba bilateral. * $p < 0.05$.

Da Silva et al. (2016), en su estudio realizado en saliva de niños de 0 a 3 años con y sin presencia de caries, encontraron que el daño oxidativo se reducía en la saliva de niños con presencia de caries como consecuencia del aumento de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Nair et al. (2017) realizaron un estudio en pacientes adultos con DM2 y controles sanos y observaron que el grupo de DM2 presentaba mayor concentración de MDA y actividad aumentada de la SOD. Arana et al. (2017) también realizaron un estudio en pacientes con DM2 con buen y mal control metabólico y un grupo de controles sin diabetes, en donde analizaron las diferencias en los niveles de EO salival, encontrando una actividad significativamente aumentada de la GPx en el grupo de pacientes con diabetes con

buen control metabólico en comparación con el grupo control, concluyendo al igual que Nair et al., (2017) que dicho aumento podría reflejar un mecanismo compensatorio en un intento por prevenir el daño oxidativo ante un incremento en la producción de ERO consecuencia de la hiperglucemia crónica mantenida.

Estos resultados nos pueden hacer pensar que el aumento de la actividad de los sistemas antioxidantes presentes en saliva de los lactantes de FI + mixta, podría estar atribuido a factores compensatorios del organismo frente al incremento de las ERO con el fin de evitar el daño oxidativo.

Si bien en lactantes no se desarrollan enfermedades crónicas no transmisibles características de adultos, estas enfermedades se están presentando a edades cada vez más tempranas. Aunque en lactantes, un aumento en los sistemas antioxidantes no se ha relacionado con estas enfermedades, podemos pensar en la posibilidad de que los sistemas antioxidantes pudieran llegar a ser utilizados como marcadores de riesgo temprano y que pudieran estar relacionados con un aumento en la vulnerabilidad a desarrollar ciertas afecciones en etapas posteriores de la vida.

Algunos estudios indican el papel protector de la LM a mediano y largo plazo contra enfermedades crónicas no trasmisibles, entre ellas el sobrepeso, obesidad, hipertensión, diabetes, artritis reumatoide y cáncer (Hassiotou & Geddes, 2015; Witkowska-Zimny & Kaminska-El-Hassan, 2017).

En cuanto al análisis realizado para evaluar los resultados de la población dividida en 3 grupos se observó que la concentración de GSH fue mayor en la saliva del grupo de lactancia mixta, teniendo diferencia estadísticamente significativa con respecto a la del grupo de LM ($p = 0.005$).

En estos resultados piloto se puede observar que el grupo de FI mantiene una concentración elevada de GSH y actividad aumentada de enzimas antioxidantes en comparación con el grupo de LM. Sin embargo, estos niveles son más bajos al compararlos con el grupo de lactancia mixta. Los resultados observados podrían deberse a que, en ausencia de LM, la capacidad compensatoria

del grupo de FI estuviese disminuida, presentando una mayor estimulación fisiológica en el grupo de lactancia mixta.

La enzima GPx mostró mayor actividad en la saliva del grupo de lactancia mixta, en comparación con la del grupo de lactancia materna ($p = 0.012$); mientras que, la (CAT presentó mayor actividad en la saliva del grupo de lactancia mixta en comparación con la de la saliva de los lactantes alimentados con leche materna ($p = 0.001$) y fórmula infantil ($p = 0.002$). En la **Figura 6** se muestra las gráficas de cajas para los sistemas antioxidantes en la población dividida en tres grupos.

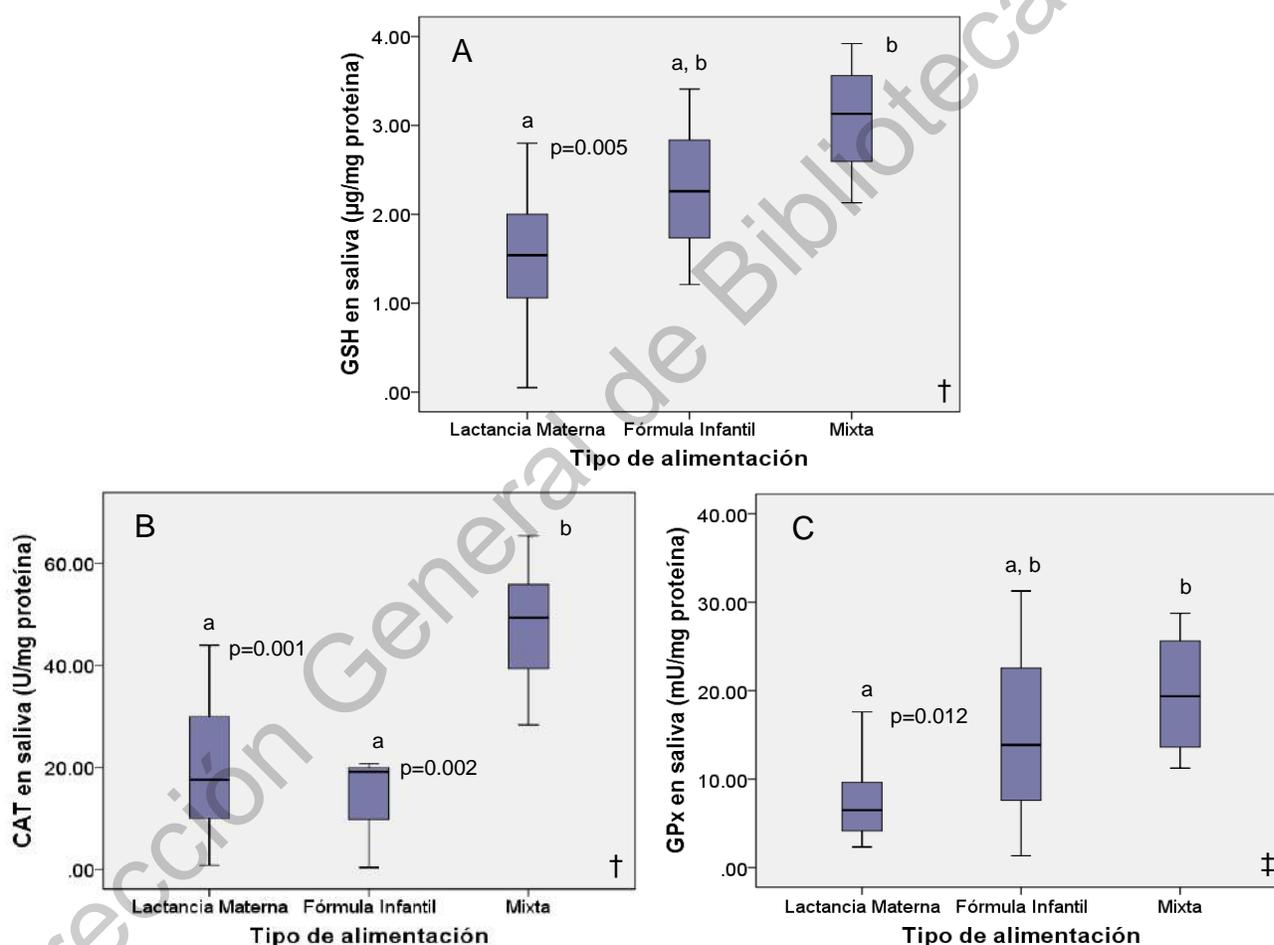


Figura 6. Sistemas antioxidantes en saliva de lactantes (grupo piloto).

(A) Concentración de GSH con una $p= 0.005$ entre los grupos de lactancia materna y lactancia mixta. (B) Actividad enzimática de CAT con una $p= 0.001$ entre los grupos de lactancia materna y lactancia mixta y una $p=0.002$ entre los grupos de FI y lactancia mixta. (C) Actividad enzimática de GPx, con una $p=0.012$ entre los grupos de lactancia materna y lactancia mixta. †Prueba de ANOVA. ‡Prueba de Kruskal-Wallis. Prueba unilateral. Las letras minúsculas representan una $p < 0.05$ por Tukey.

Arana et al. (2017) reportaron que la actividad de la GPx fue significativamente menor ($p < 0.001$) en el grupo de pacientes con mal control metabólico al compararlos con el grupo control sin diabetes y el grupo de buen control metabólico, concluyendo que en este caso que un deficiente control metabólico se traduciría en una intensa producción de RL de manera crónica, agotando la capacidad compensadora de los sistemas antioxidantes enzimáticos. Aunque el estudio de Arana et al 2017 y el presente son diferentes, sus resultados nos pueden hacer pensar que en este caso hay una mayor capacidad de respuesta, a nivel de sistemas antioxidantes, en los lactantes alimentados con LM en forma mixta al compararlos con aquellos que sólo reciben FI.

7.2.2 Marcadores de inflamación

Se analizó la concentración de citocinas proinflamatorias (IL1 β y TNF- α) en la saliva de los lactantes incluidos en cada grupo.

Los marcadores de inflamación medidos en saliva tuvieron concentraciones mayores en el grupo de lactantes de FI + mixta al compararlos con el valor del grupo de lactantes de LM, con una $p = 0.049$ para IL-1 β y $p = 0.002$ para TNF- α . A continuación, en la **Figura 7** se muestran las gráficas de cajas correspondientes.

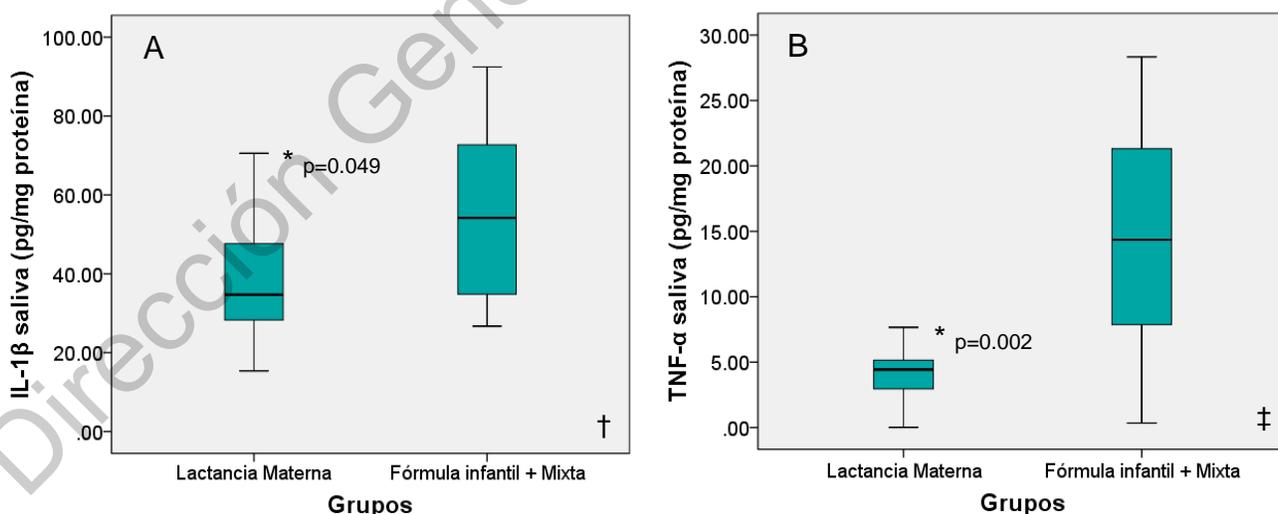


Figura 7. Marcadores de inflamación medidos en saliva.

(A) IL-1 β con una $p = 0.049$. (B) TNF- α , $p = 0.002$. †Prueba t-student. ‡Prueba U Mann-Whitney. Prueba bilateral * $p < 0.05$.

De acuerdo con los antecedentes con los que contamos, poco es conocido sobre la naturaleza y el significado de las diferentes concentraciones de citocinas en saliva. Las citocinas son los principales mensajeros proteínicos intercelulares del SI, facilitan la comunicación entre el SI y el resto del organismo y son fundamentales para el crecimiento, el desarrollo, regulación de inflamación y mantenimiento de la salud. Las principales citocinas involucradas en iniciar y mantener la inflamación son: IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α . La inflamación crónica y la desregularización en la secreción de citocinas tanto al alza como a la baja están involucradas en procesos patológicos (Riis et al., 2015).

Si bien, no contamos con estudios previos que nos permita determinar si el comportamiento de los marcadores de inflamación en la población estudiada es adecuado, al tomar el grupo de lactantes con LM como control podemos observar que los bebés alimentados con FI + mixta, presentan niveles más altos de estos marcadores. Dichas diferencias son de importancia estadística y podrían ser de importancia clínica. Diferentes estudios han observado que los niveles de citocinas en saliva reflejan la actividad inmunitaria oral. Aunque la mucosa oral no es parte central del SI, se considera que las células de la mucosa están involucradas en la respuesta inmunológica a través de la producción de citocinas; además de que, la concentración de citocinas en saliva puede reflejar el comportamiento de las concentraciones encontradas en sangre. Dichas citocinas a concentraciones basales cumplen con funciones de protección. Por el contrario, a concentraciones más elevadas pueden llegar a desencadenar procesos patológicos de importancia (Winkler et al., 2001; Riis et al., 2015).

Un papel fundamental de la LM es evitar procesos de inflamación en el lactante. Las propiedades antiinflamatorias de la leche incluyen mecanismos directos e indirectos, de manera que la LM es capaz de brindar inmunidad pasiva por medio de inmunoglobulinas, factores bactericidas, citocinas, hormonas, factores de crecimiento, entre otros, los cuales combaten las noxas biológicas sin causar inflamación, estimulando a su vez la especialización del SI del lactante. La LM también brinda un conjunto de receptores como el receptor I del TNF- α (TNF-RI), el

cual reduce la actividad inflamatoria del TNF- α uniéndolo directamente en el lumen intestinal (Castellote et al., 2011).

La baja o nula ingesta de LM en el grupo de FI + mixta podría explicar el aumento de citocinas proinflamatorias secundarias no solo a un posible aumento de ERO, sino también en relación con un bajo aporte de receptores de estas citocinas, lo que dificulta la modulación de sus concentraciones.

La hipótesis planteada acerca del comportamiento compensatorio de los sistemas antioxidantes medidos en saliva, puede sustentarse tomando en consideración las concentraciones más altas de marcadores de inflamación en las muestras de saliva del grupo de FI + mixta. Dado que la inflamación y el EO se encuentran estrechamente vinculados y el aumento de uno desencadena la respuesta del otro.

En cuanto a la evaluación de marcadores de inflamación realizado en saliva con la población dividida en 3 grupos, se encontró que la concentración de ambas citocinas fue mayor en el grupo de lactancia mixta, representando una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la del grupo de lactancia materna, siendo ésta de $p = 0.019$ para IL-1 β y $p = 0.006$ para TNF- α . En la **Figura 8** se muestran las gráficas de cajas representativas para cada citocina. Estos resultados concuerdan con lo observado en el análisis de sistemas antioxidantes.

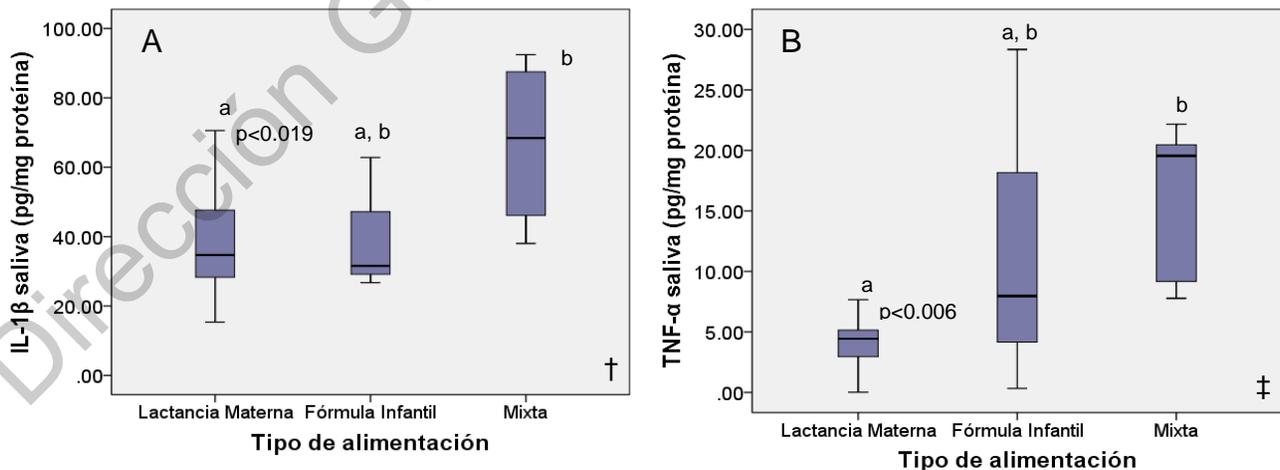


Figura 8. Concentración de marcadores de inflamación en saliva (grupo piloto).

(A) IL-1 β . (B) TNF- α . †Prueba de ANOVA. ‡Prueba de Kruskal-Wallis. Prueba unilateral. Las letras minúsculas representan una $p < 0.05$ por Tukey.

7.2.3 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se analizó en las muestras de saliva por medio de las pruebas DPPH y FRAP. Si bien estas pruebas por sí mismas no pueden describir un proceso biológico, ya que están basadas en reacciones químicas *in vitro*, pueden tomar más validez al ser acompañadas de otro tipo de pruebas como las que se prestan en este estudio.

Las pruebas de capacidad antioxidante no mostraron diferencias estadísticamente significativas al evaluar el porcentaje de inhibición (% de inhibición) en las muestras de saliva de ambos grupos de estudio. Para la prueba de DPPH se obtuvo una $p= 0.075$; mientras que, en la prueba de FRAP la comparación entre ambos grupos proporcionó una $p= 0.893$. El porcentaje de inhibición es proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra analizada. En la **Figura 9** se muestran las gráficas de cajas correspondientes a estas pruebas.

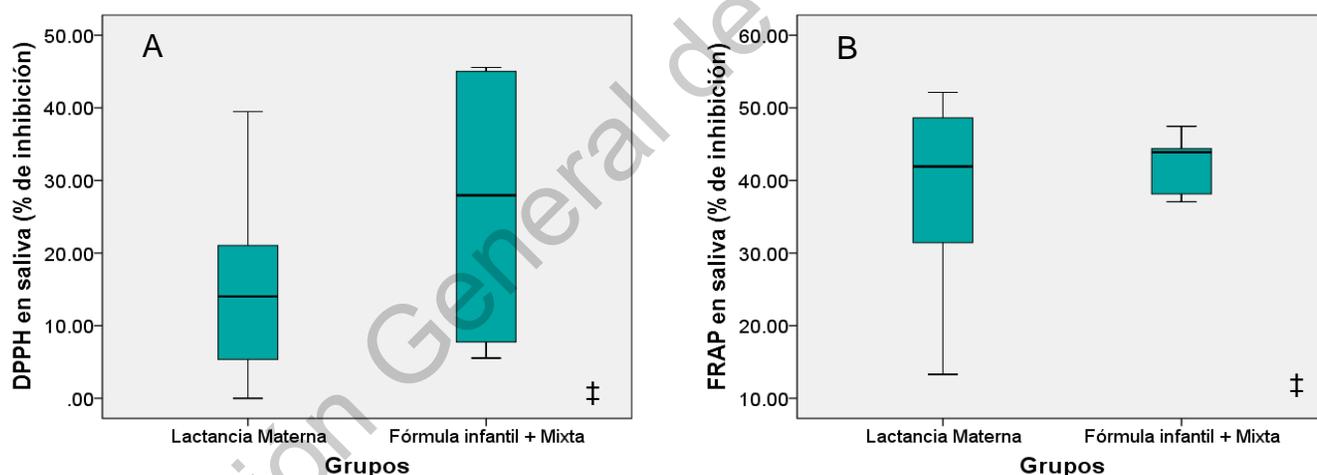


Figura 9. Pruebas de capacidad antioxidante en saliva de lactantes.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad antioxidante medida en la saliva de ambos grupos para la prueba de DPPH (A) y FRAP (B). ‡Prueba U Mann-Whitney. Prueba bilateral * $p < 0.05$.

Los resultados de este estudio en cuanto a capacidad antioxidante, difieren con lo observado por Aycicek et al. (2006), quienes encontraron que la capacidad antioxidante total medida en plasma de lactantes alimentados con LM era significativamente mayor ($p < 0.013$) a la del grupo de lactantes alimentados con FI.

Se observó a su vez una correlación positiva entre la actividad de la CAT en saliva de los lactantes del grupo de FI + mixta con el % de inhibición evaluado por medio de la prueba de DPPH, lo cual tiene sentido, ya que al haber un aumento de sistemas antioxidantes en el organismo es de esperar que la capacidad antioxidante medida también muestre niveles elevados. En la **Tabla 6** se muestran las correlaciones de variables entre los grupos de LM y FI + mixta.

Para la población dividida en 3 grupos se obtuvo, por medio de la prueba de DPPH, un % de inhibición mayor en la saliva del grupo de lactancia mixta al compararlo con el grupo de LM ($p < 0.0001$) y el grupo de FI ($p=0.001$). En la **Figura 10** se muestran las gráficas correspondientes a las pruebas de capacidad antioxidante. Estos resultados concuerdan con lo observado al evaluar los sistemas antioxidantes y marcadores de inflamación. Todos estos hallazgos en su conjunto podrían respaldar la teoría de la posible respuesta compensatoria por parte del grupo de lactancia mixta y el agotamiento de esta misma respuesta en el grupo de FI.

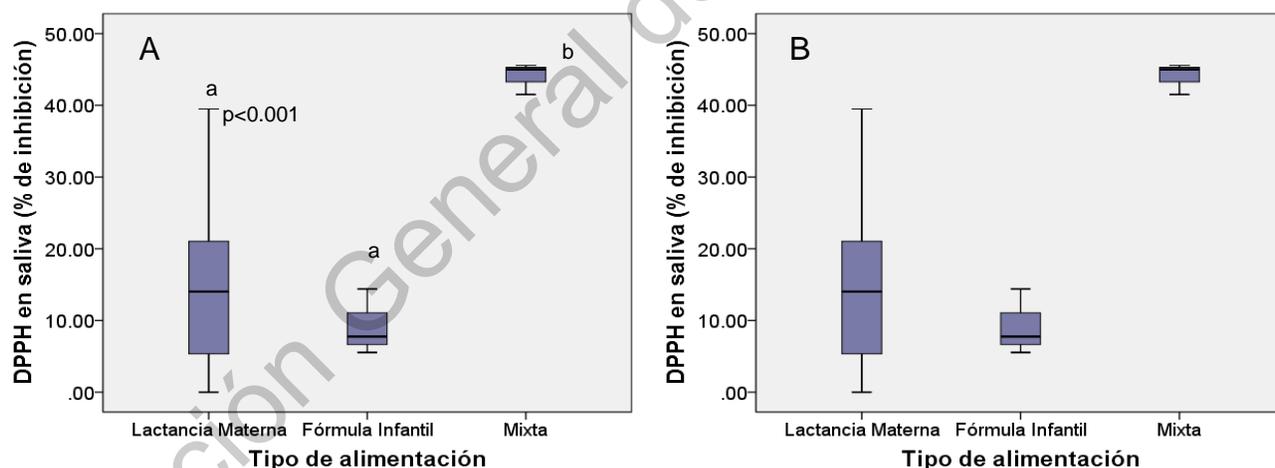


Figura 10. Pruebas de capacidad antioxidante total en saliva de lactantes (grupo piloto).

(A) La capacidad antioxidante de la saliva con base a la prueba DPPH tiene mayor % de inhibición en la saliva de lactantes que reciben alimentación mixta en comparación con el grupo de lactancia materna ($p < 0.001$) y fórmula infantil ($p = 0.001$). (B) La prueba de FRAP muestra mayor % de inhibición en el grupo de lactancia mixta, sin representar un resultado significativo con respecto a los demás grupos. Prueba ANOVA de una vía. Las letras minúsculas representan una $p < 0.05$ por Tukey.

Tabla 2. Sistemas antioxidantes, marcadores de inflamación y capacidad antioxidante en saliva con relación al tipo de alimentación.

	LM n=20	FI + Mixta n= 8	p
Sistemas antioxidantes			
GSH (µg/mg proteína) †	1.53 ± 0.18	2.74 ± 0.35	0.002*
GPx (mU/mg proteína) ‡	7.31 ± 0.91	18.13 ± 3.56	0.005*
CAT (U/mg proteína) ‡	20.35 ± 2.79	34.83 ± 7.66*	0.062
Marcadores de inflamación			
IL-1β (pg/mg proteína) †	38.65 ± 3.52	55.49 ± 9.59	0.049*
TNF-α (pg/mg proteína) ‡	4.03 ± 0.53	14.47 ± 3.35	0.002*
Capacidad antioxidante			
DPPH (% de inhibición) ‡	14.86 ± 2.58	29.68 ± 7.21	0.075
FRAP (% de inhibición) ‡	39.55 ± 2.41	41.93 ± 1.54	0.893

GSH, glutatión reducido; GPx, glutatión peroxidasa; CAT, catalasa; IL-1β, interleucina 1 beta; TNF-α, factor de necrosis tumoral alfa; DPPH, prueba de capacidad antioxidante; FRAP, prueba de capacidad antioxidante

Los datos están representados como media ± error estándar.

†Prueba t-Student.

‡Prueba U Mann-Whitney para muestras independientes

Prueba bilateral. *p < 0.05.

Tabla 3. Sistemas antioxidantes, marcadores de inflamación y capacidad antioxidante en saliva con relación al tipo de alimentación.

	LM n=20	FI n=3	Mixta n=5	p
Sistemas antioxidantes				
GSH (µg/mg proteína) †	1.53 ± 0.18 ^a	2.29 ± 0.63 ^{a,b}	3.08 ± 0.37 ^b	0.005
GPx (mU/mg proteína) ‡	7.31 ± 0.91 ^a	15.49 ± 8.68 ^{a,b}	19.72 ± 3.36 ^b	0.012
CAT (U/mg proteína) †	20.34 ± 2.79 ^{a1}	13.41 ± 6.54 ^{a2}	47.69 ± 6.43 ^b	0.001 ^{a1} 0.002 ^{a2}
Marcadores de inflamación				
IL-1β (pg/mg proteína) †	38.65 ± 3.52 ^a	40.38 ± 11.30 ^{a,b}	66.82 ± 12.56 ^b	0.019
TNF-α (pg/mg proteína) ‡	4.03 ± 0.53 ^a	12.22 ± 8.36 ^{a,b}	15.83 ± 3.04 ^b	0.006
Capacidad antioxidante				
DPPH (% de inhibición) †	14.86 ± 2.58 ^a	9.23 ± 2.66 ^a	44.03 ± 1.27 ^b	0.001
FRAP (% de inhibición) †	39.55 ± 2.41	39.69 ± 2.48	43.60 ± 1.76	0.749

Los datos están representados como media ± error estándar.

†Prueba de ANOVA.

‡Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes.

Las letras minúsculas representan una p<0.05 por Tukey.

Prueba unilateral.

7.3 Análisis en leche

7.3.1 Sistemas antioxidantes y marcadores de inflamación

Se analizaron los sistemas antioxidantes y marcadores de inflamación en la LM, así como la capacidad antioxidante total. Los resultados en este apartado se clasificaron en dos grupos, de manera que se analizaron en uno de los grupos las muestras de leche de aquellas mujeres que brindaron LME contra las muestras de leche de mujeres que brindaban lactancia mixta. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Sistemas antioxidantes, marcadores de inflamación y capacidad antioxidante en LM.

	Leche materna en mujeres con LME n=20	Leche materna en mujeres con lactancia mixta n=4	p
Sistemas antioxidantes			
GSH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)	0.011 \pm 0.002	SD	NA
GPx (mU/mg proteína)	0.079 \pm 0.013	0.145 \pm 0.033	0.089
CAT (U/mg proteína)	0.282 \pm 0.035	0.304 \pm 0.134	0.824
Marcadores de inflamación			
IL-1 β (pg/mg proteína)	0.53 \pm 0.04	0.59 \pm 0.11	0.508
TNF-α (pg/mg proteína)	0.47 \pm 0.04	0.57 \pm 0.31	0.792
Capacidad antioxidante			
DPPH (% inhibición)	14.11 \pm 1.68	SD	NA
FRAP (% inhibición)	57.65 \pm 3.71	66.36 \pm 5.62	0.330

SD: sin dato; NA: no aplica.

Datos expresados como media \pm error estándar.

Prueba t-Student.

Prueba bilateral.

Se pueden observar en los resultados obtenidos que los sistemas antioxidantes, los marcadores de inflamación y la capacidad antioxidante, se encuentran más elevados en el grupo de mujeres que brindaban lactancia mixta; sin embargo, esto no representa una diferencia estadísticamente significativa para ninguna de las variables estudiadas.

L'Abbe et al.(2000) midieron la actividad enzimática de GPx en la LM de lactantes a término alimentados con LME, obteniendo una media de 12.3 mU/mg de proteína. En el presente estudio, se obtuvo una media 0.079 mU/mg de proteína, la cual se encuentra muy por debajo de lo observado por L'Abbe et al. (2000), incluso nuestros resultados se ubican por debajo de las muestras de LM de lactantes prematuros en donde la media fue de 10.2 mU/mg de proteína. La diferencia entre la actividad enzimática observada por L'Abbe y la observada en nuestro estudio puede ser secundaria a las condiciones de almacenamiento de las muestras desde su obtención hasta su traslado al laboratorio en dónde fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

De acuerdo con este mismo grupo de investigadores la congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ no modifica significativamente la actividad de la GPx o SOD.

Akdag et al. (2014) también comprobaron que el almacenamiento de calostro a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 meses conservaba su capacidad antioxidante, sin mostrar cambios con relación al calostro fresco. Por su parte, Ankrah et al. (2000) demostraron en su investigación que al almacenar la LM bajo diferentes temperaturas durante 2 h se perdía una cantidad importante de GSH, observando una disminución de hasta 5 veces en su concentración en LM madura almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h en comparación con la LM fresca. Xavier et al. (2011) observaron el mismo fenómeno al medir la capacidad antioxidante de calostro, leche de transición y leche madura almacenada a diferentes temperaturas y bajo distintos tiempos. Concluyendo que era necesario evitar congelar la LM para su posterior utilización debido a la pérdida progresiva de antioxidantes. Tomando en cuenta que nuestras muestras estuvieron almacenadas a una temperatura aproximada de $4-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante un tiempo de 2-6 horas, podría pensarse en una disminución importante en la concentración de GSH y actividad de las enzimas antioxidantes medidas.

Otra posible causa podría estar relacionada con lo encontrado por Yuksel et al. (2015), quienes observaron que a medida que el lactante crecía, la concentración de compuestos antioxidantes disminuía. Respecto a este punto, las muestras del estudio de referencia fueron tomadas en la semana 12 postparto; mientras que, la media de las muestras analizadas en nuestro estudio se recolectó en la semana 16.

En nuestro estudio se observó una correlación positiva ($r= 0.527$; $p= 0.017$) entre la actividad de la GPx y la CAT en LM, se sabe que la GPx es la primera enzima en aumentar su actividad ante la elevación de agentes oxidantes. A medida que los agentes oxidantes aumentan, se hace necesaria la activación de la CAT; por lo tanto, el aumento en la actividad de la GPx desencadenará una mayor actividad de la CAT.

Existen algunos estudios relacionados con el análisis de las concentraciones de citocinas en LM, las cuales pueden ser importantes en la estimulación del SI del lactante. Las citocinas se han medido en diferentes etapas de lactancia. Hawkes et

al. (1999) evaluaron la concentración de las citocinas IL-1 β y TNF- α durante las primeras 12 semanas de lactancia, obteniendo una media de 10 pg/mL de IL-1 β y 58 pg/mL de TNF- α . Riskin et al., (2012) midieron la concentración de estas citocinas en leche de madres de lactantes con fiebre y realizó la comparación con un grupo control de madres con lactantes sanos, en dónde observó que los niveles de TNF- α aumentaron de forma significativa durante la infección activa, sus resultados mostraron una media de 3.66 pg/mL en el grupo de lactantes enfermos y 2.97 pg/mL en el grupo control. Por último, Freitas et al. (2019) evaluaron la concentración de IL-1 β y TNF- α en LM madura de mujeres con preeclamsia y lactantes prematuros y mujeres sin preeclamsia con lactantes prematuros, ellos observaron concentraciones medias de IL-1 β =18.7 pg/mL y 30.7 pg/mL de cada grupo respectivamente y de TNF- α = 9.6 pg/mL y 11.9 pg/mL, sin observar una diferencia de significancia estadística entre los grupos.

En las muestras de LM analizadas en este estudio, se observó una concentración aparentemente menor con una media de 0.53 pg/mg de proteína para la IL-1 β y de 0.47 pg/mg de proteína para el TNF- α . Sin embargo, hay que mencionar que los resultados señalados por los estudios anteriores se encuentran reportados en diferentes unidades; mientras que, nuestros resultados se estandarizaron de acuerdo con la concentración de proteína de cada muestra de leche. También es de notar que los resultados de Hawkes et al. (1999) y Riskin et al. (2012) los cuales fueron obtenidos de una población aparentemente sana, refiriéndonos al grupo control, y aproximadamente en la misma etapa de lactancia, y quienes también utilizaron kits ELISA para el análisis de sus muestras, también difieren de manera importante en cuanto a sus resultados, consecuencia probablemente de las condiciones constantemente cambiantes en la composición de la LM. Dichas condiciones dependen de múltiples factores de importancia y en ocasiones difíciles de controlar, que van desde el tipo de alimentación de la madre, la región geográfica, la etapa de la lactancia, la hora del día en la que las muestras fueron obtenidas, el tipo de leche obtenida hablando de leche temprana o leche tardía, entre muchas más, las cuales han hecho difícil la estandarización de los factores bioactivos presentes en LM, por lo que se requieren mayores estudios al respecto.

Como sabemos, la LM es rica en compuestos bioactivos cuya función es proteger al lactante frente a la exposición de patógenos, estimulando al mismo tiempo su SI, y promoviendo principalmente la especialización del SI adaptativo, con el fin de ir formando una respuesta más especializada y eficaz. La LM también brinda elementos que ayudan a controlar las concentraciones y facilitar la absorción de ciertos compuestos en el organismo del lactante. Entre estos compuestos tenemos diferentes tipos de receptores celulares, que en el caso de las citocinas proinflamatorias ayudan a modular su concentración; de manera que, estas citocinas puedan cumplir con sus funciones de señalización celular y estimulación del SI sin llegar a ocasionar daño. Esto en virtud de que muchos de las moléculas presentes en nuestro organismo a concentraciones basales cumplen funciones de protección mientras que a concentraciones elevadas pueden desencadenar procesos patológicos.

Se ha mencionado también que ante la presencia de patógenos o probables agentes dañinos, las citocinas cumplen con funciones de señalización que permiten la activación de fagocitos, que al momento de fagocitar un microorganismo producen un conjunto de ERO que permiten su eliminación. Estas ERO son a su vez neutralizadas por los sistemas antioxidantes. Dentro de nuestro estudio se observó que existe una correlación positiva entre la actividad de GPx en LM y la concentración de IL- β ($r= 0.644$; $p= 0.004$) y TNF- α ($r=0.574$; $p= 0.010$) en LM. También se encontró una correlación positiva entre la concentración GSH de LM con el contenido de IL-1 β en LM ($r= 0.671$; $p= 0.003$), quizás esta relación exista con el objetivo de mantener un estado de homeostasis en caso de una probable respuesta inflamatoria y como parte de la respuesta protectora de la LM. En este mismo contexto también se observó una correlación positiva entre la actividad de la CAT en saliva con la concentración de IL-1 β en saliva en el grupo de lactantes con LM, lo cual también puede estar ligada a la relación que existe entre la respuesta inflamatoria y la antioxidante.

La concentración de IL-1 β en LM también tuvo una correlación positiva con los niveles de TNF- α en LM ($r= 0.650$; $p=0.004$). La IL-1 β tiene como una de sus

funciones activar la secreción de TNF- α ; es por esto por lo que, el aumento de IL-1 β normalmente precede el aumento de TNF- α .

7.3.2 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se midió en LM y FI por medio de las pruebas DPPH y FRAP. En la **Tabla 5** se muestra el porcentaje de inhibición para las muestras de ambos tipos de leche.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición en LM y FI.

	LM n=21	FI n=7	p
DPPH (% de inhibición)	14.01 \pm 1.60	nd	NA
FRAP (% de inhibición)	60.99 \pm 2.56	37.42 \pm 12.40	0.179

nd: no detectable; NA: no aplica

Los datos están representados como media \pm error estándar.

Prueba U Mann-Whitney para muestras independientes.

Prueba bilateral *p<0.05

El % de inhibición de la FI, en cuanto a la prueba de DPPH, arrojó cifras por debajo de la curva de calibración, considerando que por medio de esta prueba no fue posible detectar la capacidad antioxidante total en FI. En la **Figura 11** se representa la comparación de capacidad antioxidante entre LM y FI por medio de gráficas de cajas.

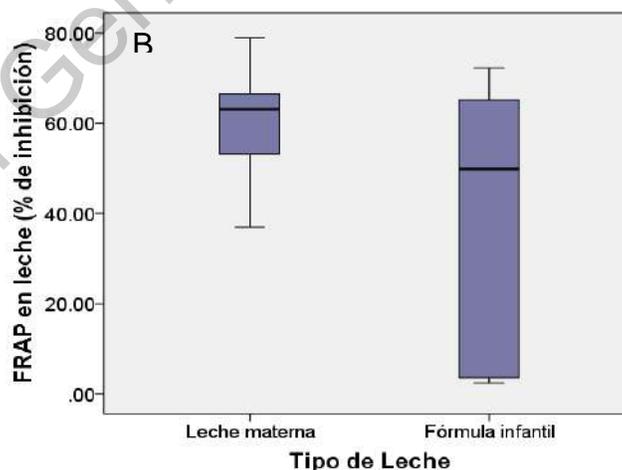


Figura 11. Capacidad antioxidante total en LM y FI por medio de la prueba de FRAP. Prueba de U Mann-Whitney para muestras independientes. Prueba bilateral p< 0.05.

La capacidad antioxidante total medida por medio de FRAP en LM y FI no representó una diferencia estadísticamente significativa; sin embargo, la LM presentó una tendencia mayor en esta prueba. Ezaki et al. (2008), al igual que Oveisi et al. (2010), observaron que la LM proveía mejor capacidad antioxidante que la FI. Por lo cual el uso temprano de la LM se considera extremadamente importante y útil en la protección del lactante contra el EO.

Zarban et al. (2009) midieron el % de inhibición en LM madura a los 90 y 180 días postparto, obteniendo una media de 44.6 % y 38.2 % respectivamente. Nosotros observamos un % de inhibición por medio de la prueba de DPPH en LM de 14.01 %. Tomando en cuenta que el promedio de nuestras muestras se obtuvo alrededor del día 117 postparto, este porcentaje se considera menor al observado por Zarban et al., (2009).

En otro estudio Sandal et al. (2013) realizaron un comparativo de la capacidad antioxidante total de las muestras de calostro de mujeres con lactantes a término (1.67 ± 0.19 mmol ET/L) y pretérmino (1.79 ± 0.20 mmol ET/L), sin encontrar diferencias de capacidad antioxidante entre ellas.

Tabla 6. Correlación de variables entre los grupos de LM y FI + mixta

Variables	r	p
Grupo LM		
CAT en saliva - IL-1 β en saliva †	0.620	0.008
GPx en LM - CAT en LM	0.527	0.017
GPx en LM - IL-1 β en LM	0.644	0.004
GPx en LM - TNF- α en LM	0.574	0.010
IL-1 β en LM - GSH en LM	0.671	0.003
IL-1 β en LM - TNF- α en LM	0.650	0.004
Grupo FI + mixta		
Edad del lactante - FRAP saliva †	0.926	0.003
CAT en saliva - DPPH en saliva †	0.857	0.007

Prueba de Pearson

† Prueba Rho de Spearman

A la fecha hay muy pocos estudios que nos hablen sobre la actividad de los sistemas antioxidantes o la concentración de los marcadores de inflamación en bebés de acuerdo con el tipo de lactancia recibida. Los estudios al respecto se han realizado por medio de muestras sanguíneas, las cuales resultan invasivas y estresantes en esta población, o por medio de muestras de orina. Sin embargo, hasta el momento ningún estudio había medido estos parámetros y su relación con la alimentación por medio de muestras de saliva.

Una de las debilidades de nuestro estudio es el tamaño de muestra para los grupos de FI y lactancia mixta; ya que, por el número de mamás participantes se pierde poder estadístico. Esta es la principal razón por la cual se decidió unir estos dos grupos y dejar los resultados de la clasificación en tres grupos como una prueba piloto que nos dé una visión general del posible comportamiento de los marcadores estudiados en cada una de las poblaciones. Sin embargo, aún con la fusión del grupo de FI y lactancia mixta, nuestro número de muestra se mantiene bajo.

Por lo cual una de las perspectivas a futuro sería realizar un estudio en dónde se incremente la población de los grupos antes mencionados que nos permita analizar los resultados con mayor claridad. Otra investigación considerada interesante es el análisis de los sistemas antioxidantes y marcadores de inflamación en LM de mujeres que brindan LME y lactancia mixta, ya que en este estudio no se demostró que hubiera una diferencia de significancia estadística entre estos factores medidos en un grupo u otro. Sin embargo, el aumento en el tamaño de las muestras de leche del grupo de mujeres que brindan lactancia mixta bien podría modificar de manera interesante estos resultados.

VIII. CONCLUSIÓN

Los niveles mayormente elevados de sistemas antioxidantes (GSH y GPx) y marcadores de inflamación (IL-1 β y TNF- α) en saliva de lactantes que reciben FI, ya sea de manera exclusiva o mixta, parecen estar relacionados con una respuesta compensatoria del organismo ante un posible incremento de ERO.

La capacidad antioxidante de la LM en comparación con la FI no mostró diferencias significativas. Sin embargo,

La LM de madres del grupo de lactancia mixta en comparación con la LM de madres del grupo de LM exclusiva no muestra una diferencia de significancia estadística; por lo que, en este estudio, la composición de la leche del grupo de lactancia mixta no se ve afectada por la introducción de FI.

La LM es el alimento ideal para el desarrollo de lactante. Es capaz de brindar los elementos necesarios no solo para el crecimiento sino también para la protección del lactante. Dentro de los compuestos que actúan en pro de la protección del lactante tenemos los sistemas antioxidantes y los marcadores de inflamación que también favorecen la especialización del SI. Aun cuando no se brinde de manera exclusiva la LM continúa siendo un fluido capaz de adaptarse a las necesidades específicas del lactante.

Es necesario continuar generando estudios de análisis de sistemas antioxidantes, marcadores de inflamación y marcadores de estrés o daño oxidativo en saliva de lactantes en relación con el tipo de lactancia brindada. A su vez, resulta de importancia el análisis de estos mismos compuestos en la LM. Lo anterior, con el objetivo de ir marcando un referente sobre el comportamiento de los compuestos estudiados, que nos permita en un futuro emplearlos como marcadores de riesgo.

IX. REFERENCIAS

- Aceti, A., Beghetti, I., Martini, S., Faldella, G. and Corvaglia, L. (2018). Oxidative Stress and Necrotizing Enterocolitis: Pathogenic Mechanisms, Opportunities for Intervention, and Role of Human Milk. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018(1), 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/7397659>
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105(1947), 121–126.
- Aguilar-Cordero, MJ., Baena-García, L., Sánchez-López, AM., Guisado-Barrilao, R., Hermoso-Rodríguez, E. & Mur-Villar, N. (2016). Beneficios inmunológicos de la leche humana para la madre y el niño. Revisión sistemática. *Nutrición Hospitalaria*, 33(2), 482–493. <https://doi.org/doi:10.20960/nh.v33i1.13>.
- Akdag, A., Nur Sari, F., Dizdar, E. A., Uras, N., Isikoglu, S., Erel, O., & Dilmen, U. (2014). Storage at -80°C Preserves the Antioxidant Capacity of Preterm Human Milk. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 28(5), 415–418. <https://doi.org/10.1002/jcla.21703>
- Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of Food Biochemistry*, 44(July 2019), 1–13. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13145>
- Aly, E., Darwish, A. A., Lopez-Nicolas, R., Frontela-Saseta, C., & Ros-Berruezo, G. (2016). Bioactive Components of Human Milk: Similarities and Differences between Human Milk and Infant Formula. *IntechOpen*, i(Selected topics in breastfeeding), 11–26. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Le-doare, K. M. (2016). Early Human Development Human breast milk : A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, 91(11), 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- Ankrah, N. A., Appiah-Opong, R., & Dzokoto, C. (2000). Human breastmilk storage and the glutathione content. *Journal of Tropical Pediatrics*, 46(2), 111–113. <https://doi.org/10.1093/tropej/46.2.111>

- Arana, C., Moreno-Fernández, A. M., Gómez-Moreno, G., Morales-Portillo, C., Serrano-Olmedo, I., de la Cuesta Mayor, M. C., & Martín Hernández, T. (2017). Increased salivary oxidative stress parameters in patients with type 2 diabetes: Relation with periodontal disease. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, *64*(5), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2017.03.005>
- Aycicek, A., Erel, O., Kocyigit, A., Selek, S., & Demirkol, M. R. (2006). Breast milk provides better antioxidant power than does formula. *Nutrition*, *22*(6), 616–619. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.12.011>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, *60*(1), 49–74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brenmoehl, J., Ohde, D., Wirthgen, E., & Hoeflich, A. (2018). Cytokines in milk and the role of TGF-beta. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, *32*(1), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.01.006>
- Buonocore, G., & Perrone, S. (2006). Biomarkers of oxidative stress in the fetus and in the newborn. *Free Radical Biology and Medicine*, *142*(10), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.034>
- Castellote, C., Casillas, R., Ramírez-Santana, C., Pérez-Cano, F. J., Castell, M., Moretones, M. G., ... Franch, À. (2011). Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *Journal of Nutrition*, *141*(6), 1181–1187. <https://doi.org/10.3945/jn.110.133652>

- CDC. (1988). *National Health and Nutrition Examination Survey III. Body Measurements (Anthropometry)* (Vol. 1).
- Chirico, G., Marzollo, R., Cortinovis, S., Fonte, C., & Gasparoni, A. (2008). Antiinfective Properties of Human Milk. *The Journal of Nutrition*, 1801–1806. <https://doi.org/10.1093/jn/138.9.1801S>
- Da Silva, P. V., Troiano, J. A., Nakamune, A. C. M. S., Pessan, J. P., & Antoniali, C. (2016). Increased activity of the antioxidants systems modulate the oxidative stress in saliva of toddlers with early childhood caries. *Archives of Oral Biology*, 70, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.06.003>
- Dawod, B., Marshall, J. S., & Marshall, J. S. (2019). Cytokines and soluble receptors in breast milk as enhancers of oral tolerance development. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00016>
- De Gálvez, M. V. (2010). Antioxidantes en fotoprotección, ¿realmente funcionan? *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 101(3), 197–200. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2009.11.003>
- de la Torre-Carbot, K., & Chávez-Servín, J. L. (2017). Composición de la leche materna: Funciones, beneficios y bondades de sus componentes bioactivos. In *Fórmulas Infantiles. Nutrición y Tecnología* (Vol. 1, pp. 230–280). Retrieved from https://scp.com.co/precop-old/precop_files/modulo_8_vin_4/Formulas_Infantiles.pdf
- Desai, Gauri S, Mathews, S. T. (2014). Saliva as a non-invasive diagnostic tool for inflammation and insulin-resistance. *World Journal of Diabetes*, 5(6), 730–738. <https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i6.730>
- Doare, K. Le, Holder, B., Bassett, A., & Pannaraj, P. S. (2018). Mother's Milk: A purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity. *Frontiers in Immunology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00361>
- Ezaki, S., Ito, T., Suzuki, K., & Tamura, M. (2008). Association between total

antioxidant capacity in breast milk and postnatal age in days in premature infants. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 42(2), 133–137.
<https://doi.org/10.3164/jcbrn.2008019>

Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721(1–3), 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.11.001>

Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>

Freitas, N. A. de, Santiago, L. T. C., Kurokawa, C. S., Meira Junior, J. D. de, Corrente, J. E., & Rugolo, L. M. S. de S. (2019). Effect of preeclampsia on human milk cytokine levels. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 32(13), 2209–2213. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1429395>

García-López, R. R. (2011). Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediátrica de México*, 32(4), 223–230. Retrieved from <http://ojs.actapediatrica.org.mx/index.php/APM/article/viewFile/494/493>

Garofalo, R. (2010). Cytokines in Human Milk. *Journal of Pediatrics*, 156(2), 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.019>

Gebicka, L., & Krych-Madej, J. (2019). The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 197(April). <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110699>

Gila-Díaz, A., Arribas, S. M., Algara, A., Martín-Cabrejas, M. A., Pablo, Á. L. L. de, Pipaón, M. S. de, & Ramiro-Cortijo, D. (2019). A review of bioactive factors in human breastmilk: A focus on prematurity. *Nutrients*, 11(6), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nu11061307>

Gitto, E., D’Angelo, G., Cusumano, E., & Reiter, R. J. (2012). Oxidative Stress of Newborn. In Ö. Özdemir (Ed.), *Complementary Pediatrics* (pp. 73–96).

Retrieved from <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>

- Granot, E., & Kohen, R. (2004). Oxidative stress in childhood - In health and disease states. *Clinical Nutrition*, 23(1), 3–11. [https://doi.org/10.1016/S0261-5614\(03\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S0261-5614(03)00097-9)
- Greabu, M., Battino, M., Mohora, M., Totan, A., Didilescu, A., & Spinu, T. (2009). Saliva – a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *Journal of Medicine and Life*, 2(2), 124–132. <https://doi.org/>
- Gregory, K. E., Dubois, N., & Steele, T. (2014). Nutritional and immunological considerations relevant to infant nutrition. *Journal of Perinatal and Neonatal Nursing*, 28(1), 80–86. <https://doi.org/10.1097/JPN.0000000000000015>
- Gregory, K. E., & Walker, W. A. (2013). Immunologic Factors in Human Milk and Disease Prevention in the Preterm Infant. *Current Pediatrics Reports*, 1(4), 222–228. <https://doi.org/10.1007/s40124-013-0028-2>
- Gyurászová, M., Kovalčíková, A., Janšáková, K., Šebeková, K., Celec, P., & Tóthová, L. (2018). Markers of oxidative stress and antioxidant status in the plasma, urine and saliva of healthy mice. *Physiological Research*, 67(6), 921–934. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933866>
- Haida, Z., & Hakiman, M. (2019). A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Science and Nutrition*, 7(5), 1555–1563. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1012>
- Hassiotou, F., & Geddes, D. T. (2015). Immune Cell-Mediated Protection of the Mammary Gland and the Infant during Breastfeeding. *American Society for Nutrition*, 6, 267–275. <https://doi.org/10.3945/an.114.007377>.from
- Hawkes, J. S., Bryan, D.-L., James, M. J., & Gibson, R. A. (1999). Cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β 1, and TGF- β 2) and Prostaglandin E2 in Human Milk during the First Three Months Postpartum. *Pediatric Research*, 46, 194–199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1203/00006450-199908000-00012>

- Hsieh, C. C., Hernández-Ledesma, B., Fernández-Tomé, S., Weinborn, V., Barile, D., & De Moura Bell, J. M. L. N. (2015). Milk proteins, peptides, and oligosaccharides: Effects against the 21st century disorders. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/146840>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Illnait-Ferrer, J. (2012). Melatonina: actualidad de una hormona olvidada
Melatonin: the actuality of a forgotten hormone. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 43(3). Retrieved from <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-3-2012-139-150.pdf>
- L'Abbe, M. R., & Friel, J. K. (2000). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 31(3), 270–274. <https://doi.org/10.1097/00005176-200009000-00013>
- Ledo, A., Arduini, A., Asensi, M. A., Sastre, J., Escrig, R., Brugada, M. M., ... Vento, M. (2009). Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(1), 210–215. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26845>
- Lushchak, V. I. (2011). Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/736837>
- Maciejczyk, M., Szulimowska, J., Skutnik, A., Taranta-Janusz, K., Wasilewska, A., Wiśniewska, N., & Zalewska, A. (2018). Salivary Biomarkers of Oxidative Stress in Children with Chronic Kidney Disease. *Journal of Clinical Medicine*,

7(8), 209. <https://doi.org/10.3390/jcm7080209>

Matos, C., Ribeiro, M., & Guerra, A. (2015). Breastfeeding: Antioxidative properties of breast milk. *Journal of Applied Biomedicine*, 13(3), 169–180.

<https://doi.org/10.1016/j.jab.2015.04.003>

Mehta, R., & Petrova, A. (2014). Is variation in total antioxidant capacity of human milk associated with levels of bio-active proteins? *Journal of Perinatology*, 34(3), 220–222. <https://doi.org/10.1038/jp.2013.151>

Mutinati, M., Pantaleo, M., Roncetti, M., Piccinno, M., Rizzo, A., & Sciorsci, R. L. (2014). Oxidative stress in neonatology: A review. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(1), 7–16. <https://doi.org/10.1111/rda.12230>

Nair, A., & Nair, B. J. (2017). Alteration of cellular metabolism in cancer cells and its therapeutic. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 21(3), 394–401.

<https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP>

Nicholls, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2000). Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*, 51, 51–106.

OMS. (2010). Razones médicas aceptables para el uso de sucedáneos de la leche materna. In *La alimentación del lactante y del niño pequeño* (pp. 97–99).

Retrieved from

[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44310/9789275330944_spa.pdf;jsessionid=9A7DEEFB0C2FD1E248816F74292D8DB4?sequence=1&fbclid=IwAR0d8eXUhf5UGGqc1mUEZcYh9XKM3l-](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44310/9789275330944_spa.pdf;jsessionid=9A7DEEFB0C2FD1E248816F74292D8DB4?sequence=1&fbclid=IwAR0d8eXUhf5UGGqc1mUEZcYh9XKM3l-TDUZN0yyZ7RCHLTC3yPn0z6bjwb4)

[TDUZN0yyZ7RCHLTC3yPn0z6bjwb4](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44310/9789275330944_spa.pdf;jsessionid=9A7DEEFB0C2FD1E248816F74292D8DB4?sequence=1&fbclid=IwAR0d8eXUhf5UGGqc1mUEZcYh9XKM3l-TDUZN0yyZ7RCHLTC3yPn0z6bjwb4)

Oveisi, M. R., Sadeghi, N., Jannat, B., Hajimahmoodi, M., Behfar, A. ol A., Jannat, F., & Nasab, F. M. (2010). Human breast milk provides better antioxidant capacity than infant formula. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9(4), 445–449. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.912>

Ozsurekci, Y., & Aykac, K. (2016). Oxidative Stress Related Diseases in Newborns. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/2768365>

Pei Wen, L., Garssen, J., & Sandalova, E. (2016). Potential use of salivary markers for longitudinal monitoring of inflammatory immune responses to vaccination. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1–12. Retrieved from <http://www.hindawi.com/journals/mi/%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed18a&NEWS=N&AN=609151740>

Penton-Rol, G., Cervantes-Llanos, M., Martínez-Sánchez, G., Cabrera-Gmez, J. A., Valenzuela-Silva, C. M., Ramírez-Núñez, O., ... Lopez-Saura, P. A. (2009). TNF- and IL-10 downregulation and marked oxidative stress in neuromyelitis optica. *Journal of Inflammation*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-6-18>

Quiles, J. L., Ochoa, J. J., Ramirez-Tortosa, M. C., Linde, J., Bompadre, S., Battino, M., ... Mataix, J. (2006). Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Free Radical Research*, 40(2), 199–206. <https://doi.org/10.1080/10715760500404805>

Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2007). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6), 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>

Riis, J. L., Granger, D. A., Dipietro, J. A., Bandeen-Roche, K., & Johnson, S. B. (2015). Salivary cytokines as a minimally-invasive measure of immune functioning in young children: Correlates of individual differences and sensitivity to laboratory stress. *Developmental Psychobiology*, 57(2), 153–167. <https://doi.org/10.1002/dev.21271>

Riskin, A., Almog, M., Peri, R., Halasz, K., Srugo, I., & Kessel, A. (2012). Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatric Research*, 71(2), 220–225. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.34>

- Rose-John, S. (2018). Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(2), 1–17.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028415>
- Sandal, G., Uras, N., Gokmen, T., Oguz, S. S., Erdeve, O., & Dilmen, U. (2013). Assessment of oxidant/antioxidant system in newborns and their breast milks. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 26(5), 540–543.
<https://doi.org/10.3109/14767058.2012.717998>
- Schack-Nielsen, L., & Michaelsen, K. F. (2007). Advances in Our Understanding of the Biology of Human Milk and Its Effects on the Offspring. *The Journal of Nutrition*, 137(2), 503S-510S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.2.503S>
- Sepasi Tehrani, H., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 140, 5–12.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001>
- Shoji, H., Oguchi, S., Shimizu, T., & Yamashiro, Y. (2003). Effect of human breast milk on urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion in infants. *Pediatric Research*, 53(5), 850–852.
<https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000058924.30819.17>
- Soto-Ramírez, N., Boyd, K., Zhang, H., Gangur, V., Goetzl, L., & Karmaus, W. (2016). Maternal serum but not breast milk IL-5, IL-6, and IL-13 immune markers are associated with scratching among infants. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13223-016-0129-x>
- Spielmann, N., & Wong, D. (2011). Saliva: Diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Diseases*, 17(4), 345–354. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01773.x>
- Tijerina-Sáenz, A., Innis, S. M., & Kitts, D. D. (2009). Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and e and fatty acid composition. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 98(11), 1793–1798. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01437.x>

- Turoli, D., Testolin, G., Zanini, R., & Bellù, R. (2004). Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatrica*, 93(12), 1569–1574. <https://doi.org/10.1080/08035250410022495>
- Ustundag, B., Yilmaz, E., Dogan, Y., Akarsu, S., Canatan, H., Halifeoglu, I., ... Denizmen Aygun, A. (2005). Levels of cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants. *Mediators of Inflammation*, 2005(6), 331–336. <https://doi.org/10.1155/MI.2005.331>
- Valaperti, A., Li, Z., Vonow-Eisenring, M., & Probst-Müller, E. (2020). Diagnostic methods for the measurement of human TNF-alpha in clinical laboratory. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 179. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113010>
- Vincenzini, M. T., Favilli, F., & Iantomasi, T. (1992). Intestinal uptake and transmembrane transport systems of intact GSH; characteristics and possible biological role. *BBA - Reviews on Biomembranes*, 1113(1), 13–23. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(92\)90032-6](https://doi.org/10.1016/0304-4157(92)90032-6)
- Winkler, O., Hadnagy, W., & Idel, H. (2001). Cytokines detectable in saliva of children as appropriate markers of local immunity of the oral cavity - An approach for the use in air pollution studies. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 204(2–3), 181–184. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00092>
- Witkowska-Zimny, M., & Kaminska-EI-Hassan, E. (2017). Cells of human breast milk. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 22(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s11658-017-0042-4>
- Xavier, A. M., Rai, K., & Hegde, A. M. (2011). Total antioxidant concentrations of breastmilk-an eye-opener to the negligent. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 29(6), 605–611.
- Yao, L., Friel, J. K., Suh, M., & Diehl-Jones, W. L. (2010). Antioxidant properties of breast milk in a novel in vitro digestion/enterocyte model. *Journal of Pediatric*

Gastroenterology and Nutrition, 50(6), 670–676.

<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181bab2d3>

Yuksel, S., Yigit, A. A., Cinar, M., Atmaca, N., & Onaran, Y. (2015). Oxidant and antioxidant status of human breast milk during lactation period. *Dairy Science and Technology*, 95(3), 295–302. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0211-z>

Zarban, A., Taheri, F., Chahkandi, T., Sharifzadeh, G., & Khorashadizadeh, M. (2009). Antioxidant and radical scavenging activity of human colostrum, transitional and mature milk. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 45(2), 150–154. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.08-233>

Dirección General de Bibliotecas UAQ

X. ANEXOS

Dirección General de Bibliotecas UAQ



ANEXO A. CONSENTIMIENTO INFORMADO
Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Comité de Bioética



Consentimiento informado para participar en un estudio de investigación titulado:

Evaluación de Marcadores Metabólicos de Riesgo en Neonatos Alimentados al Seno Materno y con
Sucedáneos de Leche Materna

Investigador principal: Dra. Karina de la Torre Carbot

Sede donde se realizará el estudio: Fac. de Ciencias Naturales UAQ y Centros de Salud del Estado de Qro.

Nombre de la participante: _____

INTRODUCCIÓN

Se le invita a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer los objetivos del estudio y del procedimiento. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia con firma y fecha.

PROPÓSITO

En este estudio se evaluarán componentes muy importantes de leche materna que sirven para nutrir a su bebé. Se necesita una muestra de leche materna y ésta será utilizada para estudiar la importancia de su consumo en bebés y la prevención de enfermedades a largo plazo. La leche sobrante, que ya no pueda ser analizada, será desechada siguiendo protocolos de manejo de muestras biológicas en laboratorios, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; sin embargo, si es posible, su leche podrá ser utilizada para estudiar algún otro componente nutritivo o bio-activo, con la finalidad de continuar estudiando la composición de la leche materna, los beneficios y/o determinar qué alimentación llevar para mejorar su calidad. También se evaluarán componentes en la saliva de su bebé, solo se necesitará una muestra pequeña que no molestará al bebé y que se llevará a cabo con las medidas de higiene necesarias para la protección del mismo.

En caso de no estar alimentando a su bebé con lactancia materna, se le pedirá la donación de una pequeña muestra de la leche con la que lo alimenta.

PROCEDIMIENTOS

Grupos de estudio. Se le realizará un cuestionario de criterios de inclusión para determinar si puede ser participante del estudio y se realizarán algunas encuestas generales. El procedimiento consiste en la aplicación de algunos cuestionarios y la toma de leche. Los cuestionarios y toma de muestras de leche se llevarán a cabo en un espacio cómodo, privado, dentro de la clínica.

Aplicación de encuestas generales.

Una vez firmado el consentimiento informado se le realizarán los siguientes cuestionarios:

1. Historia clínica donde se obtendrán sus datos generales y se le preguntará sobre antecedentes heredo familiares, antecedentes personales patológicos y antecedentes ginecobstétricos
2. Un cuestionario de estudio socioeconómico
3. Se le realizarán algunas preguntas sobre sus hábitos alimentarios, se le preguntará que es lo que regularmente come y lo que ha comido en días anteriores.
4. Se le realizarán preguntas sobre la manera en que alimenta, o ha alimentado a su bebé, y sobre el estado de salud de su bebe.

Toma de medidas antropométricas.

Se realizará la toma de medidas antropométricas a su bebé: peso, talla, pliegue tricúspital, circunferencia de brazo y perímetro cefálico, posteriormente se le entregarán resultados.

Obtención de las muestras de leche.

Se le pedirá a usted que realice la extracción de leche:

Fluido	Tiempo post-parto	Cantidad
Leche madura	>15 días a 24 meses	15 a 50 ml

Para la toma de la muestra de leche, como primera opción se le solicitará a usted misma que extraiga la leche de forma manual de acuerdo con los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud. En caso de que no pueda extraerse la leche en forma manual, podrá utilizar un extractor manual, que es un aparato con una copa que se coloca en el seno, imitará a la succión que hace su bebé. Si requiere de ayuda para usar el extractor, personal calificado podrá asesorarle cómo hacerlo. Si usted lo desea, también puede ayudarlo a usar el aparato. Si lo desea, mientras se obtiene la muestra de leche, usted puede alimentar a su bebé con el otro seno. Luego de recolectada la muestra será almacenada en hielera para llevarla al laboratorio de Nutrición Humana (FCN-UAQ) donde se almacenará a -80 °C antes de sus análisis.

EVENTOS ADVERSOS Y MOLESTIAS

Anteriormente se han realizado otros estudios sobre la composición de leche materna sin que estos hayan presentado algún perjuicio a las madres participantes. Se le proporcionará asesoría en caso de que haya dudas durante la toma de la muestra con la finalidad de que aprenda y use la técnica correcta para la obtención de su leche. Si no usa la técnica correcta es probable que usted sienta alguna molestia leve, o que note inflamación o enrojecimiento pasajero de las mamas. Sin embargo, esto no representa un riesgo a su salud. No obstante, en caso de ser necesario se le canalizará con su médico familiar.

La obtención de la muestra no vulnerará la producción de leche, ya que dicha producción es dependiente del estímulo de succión o el estímulo manual o mecánico que naturalmente ocasiona un aumento en la producción en las próximas horas sin embargo es posible que posterior a la donación de leche, en los próximos minutos su bebé tenga la necesidad de succionar más tiempo del acostumbrado para obtener la porción habitual de leche que consume.

BENEFICIOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Durante el momento de la extracción de leche habrá una persona calificada en el tema y promotora de lactancia materna, la cual ofrecerá asesoría y resolverá sus dudas.

Usted será invitada a participar en grupos de apoyo a la lactancia materna liderados por promotoras calificadas en el tema para asegurar el establecimiento y mantenimiento de la lactancia. En esos grupos de apoyo también se le otorgará información sobre buenas prácticas para llevar una alimentación correcta de usted y su bebé. Se le entregarán resultados de la evaluación antropométrica que se le haya realizado al bebé (al menos peso y talla).

CONFIDENCIALIDAD

La información obtenida en este estudio, utilizada para su identificación, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores. Los datos se utilizarán exclusivamente con fines estadísticos generales sin dar a conocer los nombres de las madres, ni de los bebés.

INFORMACIÓN DE CONTACTO

En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable al teléfono: 192 12 00 ext. 5361 con la Dra. Karina de la Torre Carbot.

Usted también tiene acceso al Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales al teléfono: 192 12 00 ext. 5346 con la Dra. Beatriz Rangel en caso de que tenga dudas sobre sus derechos como participante.

EL CONSENTIMIENTO A PARTICIPAR

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informada y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Estoy de acuerdo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Nombre y firma del participante

Fecha

Testigo 1

Fecha

Testigo 2

Fecha

He explicado a la Sra. _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha



ANEXO B. CUESTIONARIO DE SELECCIÓN



Iniciales			Folio		

Fecha de nacimiento del lactante: _____ Edad del lactante: _____

Nombre de la madre: _____ Edad: _____

Domicilio: _____ Teléfono: _____

Actualmente ¿qué alimentación le ofrece a su hijo?

a) (1) Lactancia materna (2) Mixta (3) Fórmula. En caso de elegir fórmula indique tipo y marca: _____
 ¿Recibió orientación en cuanto a la selección de la fórmula? (SI) (NO) ¿Quién la orientó? _____

¿Cuántos embarazos ha tenido? ____ Abortos ____ Edad del primer embarazo ____ Periodo intergenésico ____
 Semanas de gestación del último embarazo ____ No. de gestas en el último embarazo ____ Distocia durante el último embarazo: (SI) (NO) Complicaciones durante el embarazo o el parto (SI) (NO)
 ¿Cuáles? _____ FUM _____

Datos de la madre	Datos del lactante			
Estatura	Género	Peso actual	P/e	
Peso pregestacional	Apgar	Talla actual	T/e	
Peso al final del embarazo	Temperatura	Circ. Cefálica	P/t	
IMC PG	Peso al nacer	CB	Circ. cefálica/e	
IMC actual	Talla al nacer	PCT	CB/e	
Peso actual			PCT/e	
	¿Ha tomado medicamentos o lo han vacunado en los últimos 7 días? (SI) (NO) ¿Cuáles? Actualmente ¿cuál es el estado de salud del bebé?			

DATOS DE LA MAMÁ: Durante el embarazo o actualmente le han diagnosticado alguno de las siguientes enfermedades:

Padecimiento	1)SI	2)No	Padecimiento	1)SI	2)No
Diabetes gestacional.			Enfermedades de transmisión sexual.		
Hipotiroidismo.			Varicela.		
Obesidad mórbida.			Estreptococo grupo B.		
Rubéola.			Enfermedades cardiaca o renal.		
Pre-eclampsia.			Depresión con medicación.		
Hipertensión arterial.			Anemia.		
Toxoplasmosis.			Enfermedades infecciosas		

En caso de contestar SI a alguna de las preguntas indicar el producto utilizado.	1)SI	2)No
Durante el embarazo o lactancia ha consumido alcohol, cigarrillos, drogas, café Tipo de sustancia _____ Frecuencia _____ Cantidad _____		
Durante los últimos dos meses ¿ha recibido algún tratamiento hormonal? ¿Cuál? _____ Frecuencia _____		

Cantidad			
Ha tomado algún multivitamínico, suplemento de aceite de pescado, omega 3, aceite de hígado de bacalao, suplementos de aceite. ¿Cuál? _____ Frecuencia _____			
Cantidad			
Ha tomado algún tipo de suplemento comercial (Herbalife, omnilife etc). ¿Cuál? _____ Frecuencia _____			
Cantidad			
Durante los últimos siete días ha consumido alguno de los siguientes medicamentos:			
Riesgo muy bajo	Ciclosporina, Metoclopramida, Metromidazol, Tinidazol, Ácido 5-aminosalicílico, Salazosulfapiridina, Acetaminofeno, Acetazolamida, Aciclovir, Alopurinol, Amoxicilina, Cicloserina, Enalapril, Ibuprofeno, Ketoconazol, Ketorolaco, Loratadina, Metoprolol, Rifampicina, Estreptomina, Tetraciclina.		
Riesgo bajo	Metotrexato, Fluoxetina, Clopormazina, Haloperidol, Clofazimina, Lamotrigina, Aspirina, Clemastina, Ergotamina, Fenobarbital, Primidona, Eritromicina, Naproxeno.		
Riesgo alto	Amiodarona, Cloranfenicol, Acebutolol, Atenolol, Bromocriptina, Litio.		
Riesgo muy alto	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Fenindiona.		
Otro			
Actualmente ¿Tiene algún problema de salud? En caso de contestar SI indicar cuál _____			
Actualmente ¿Se encuentra llevando alguna dieta especial? ¿Qué tipo? _____			
¿Quién la recomendó? _____			

Hábitos personales (antes del embarazo)

Hábito	SI (1)	NO (2)	Frec.	Cant.	Hábito	SI (1)	NO (2)	Frec.	Cant.
Tabaquismo					Alcoholismo				
Drogas Tipo:					Medicamentos Tipo:				
Uso de suplementos Tipo:					Uso de complemento Tipo:				
Otros:									

Antecedentes heredo-familiares (AHF)

Patología	SI (1)	NO (2)
Diabetes		
Hipertensión		
Cáncer		
Dislipidemias		
Obesidad mórbida		
Otros		

Antecedentes personales patológicos (APP)

Patología	SI (1)	NO (2)	Tiempo de evolución y/o especificar tipo
Diabetes			
Hipertensión			
Cáncer			
Alergias			
Reemplazo hormonal o anticonceptivos			
Otros			

Recordatorio de 24 h

Tiempo de comida	Alimentos consumidos (indicar cantidades)
Desayuno	
Almuerzo	
Comida	
Colación	
Cena	

¿Cuánta agua toma al día? _____ ¿Consume refresco? _____

Dirección General de Bibliotecas UAQ



ANEXO C. CUESTIONARIO DEL LACTANTE.

Iniciales			Folio		



Fecha: ___/___/___

Instrucciones: Agradecemos su tiempo para contestar el siguiente cuestionario. Para contestarlo, en el caso de las preguntas con opciones múltiples le pedimos marcar solo una de las respuestas. Las preguntas sin opciones las puede contestar conforme a su información y experiencia propia.

Las preguntas siguientes están relacionadas con el nacimiento y la alimentación del bebé

- ¿Por cuál vía nació el bebé?**
 - Parto natural vaginal (sin anestesia o maniobra extra)
 - Parto vaginal (uso de anestesia) Indicar si se realizó alguna maniobra extra _____
 - Cesárea
- ¿En qué hospital nació su bebé?**
- En el hospital ¿su bebé estuvo en la misma habitación con usted?**
 - Sí
 - No
- Al nacer el bebé, ¿Cómo fue alimentado?**
 - Fórmula infantil (tipo de fórmula _____ ¿Cuánto tiempo fue alimentado con fórmula? _____)
 - Leche materna
 - Fórmula+ leche materna
 - Suero glucosado
- Durante el embarazo ¿Recibió orientación sobre cómo lactar? _____ ¿Quién brindó la orientación? _____ ¿Le hubiera gustado contar con un curso de apoyo antes? _____**
- ¿Necesitó de algún apoyo personal para lactar?**
 - Sí
 - No
- ¿De quién recibió apoyo?**
- ¿Cómo ha sido alimentado su bebé en los últimos dos meses y hasta la fecha?**
 - Lactancia materna exclusiva (solamente leche materna, no jugos, no té, no fórmula)
 - Lactancia predominante (el bebé es amamantado y también recibe pequeñas cantidades de agua o té)
 - Lactancia mixta o parcial (Se amamanta algunas veces y en otras se da fórmula)
 - Alimentación artificial (no recibe nada de leche materna, solamente fórmula) Indicar tipo de fórmula:
- ¿Ha introducido algún alimento o líquido además de la leche materna (LM)?**
 - Sí
 - No

10. Explique el tipo de alimento y como lo ha introducido.

En relación con su experiencia con la lactancia materna, le pedimos siga respondiendo las preguntas siguientes:

1. ¿Cuánto tiempo cree que debe durar la lactancia materna?
2. ¿Cuánto tiempo piensa usted amamantar?
3. ¿Qué dificultades o barreras ha tenido?

Dirección General de Bibliotecas UAQ



ANEXO D. FORMATO DE ESTUDIO SOCIOECONÓMICO



--	--	--	--	--	--

Iniciales

Folio

Fecha

--	--	--

día

mes

año

1. DATOS GENERALES

NOMBRE(S)	APELLIDO PATERNO	APELLIDO MATERNO	
LUGAR DE NACIMIENTO	FECHA DE NACIMIENTO	EDAD	ESCOLARIDAD

DOMICILIO

CALLE	No. EXTERIOR	
COLONIA	C.P.	LOCALIDAD
ESTADO	TELÉFONO	¿ES CABEZA DE FAMILIA?
ESTADO CIVIL () SOLTERA () VIUDA () UNIÓN LIBRE () CASADA () DIVORCIADA () SEPARADA	¿TIENE ALGUNA DISCAPACIDAD? () VISUAL () AUDITIVA () FÍSICA () LENGUAJE () MOTRÍZ () NINGUNA	

HOGAR

SU CASA ES: () Propia () Propia y la está pagando () Rentada () Prestada () Vive con un familiar	¿CUENTA CON LOS SIGUIENTES SERVICIOS DE EQUIPAMIENTO? () Energía eléctrica () Lavadora () Teléfono celular () Drenaje () Refrigerador () Horno de microondas () Agua potable () TV () Radio/Estéreo () Instalación de gas () Teléfono fijo () Computadora	
CARACTERÍSTICAS DE LA CASA () 1 Planta () Cocina () Patio () 2 Plantas () No. de recámaras () Cochera () Sala () No. de baños Otro: _____ () Comedor () Patio	EL PISO ES () Tierra () Cemento () Vitropiso Otro: _____	EL TECHO ES () Ladrillo Otro: _____ () Concreto () Lámina () Cartón
AUTOMÓVIL () Propio () Prestado () No tiene	TIPO DE COMBUSTIBLE () Gas () Carbón () Petróleo Otro: _____ () Leña	OCUPACIÓN () Estudiante () Comerciante () Hogar () Obrera () Profesionalista () Empleado Otro:

2. INTEGRANTES DEL HOGAR E INGRESOS ECONÓMICOS

NOMBRE	EDAD	PARENTESCO	ESCOLARIDAD	OCUPACIÓN

3. SERVICIOS QUE HAY EN EL LUGAR DONDE VIVE

<input type="checkbox"/> Escuela	<input type="checkbox"/> Centro de Salud	<input type="checkbox"/> Pavimento	<input type="checkbox"/> Alumbramiento público	<input type="checkbox"/> Transporte público	<input type="checkbox"/> Sistema de recolección de basura
----------------------------------	--	------------------------------------	--	---	---

4. SALUD

CUENTA CON SERVICIOS DE:

IMSS ISSSTE Seguro popular Particular PEMEX

5. HA RECIBIDO ALGÚN APOYO DE GOBIERNO ESTATAL O MUNICIPAL

Si No

Si su respuesta fue SI, favor de indicar que tipo de apoyo recibió:

Prospera Congreso del Estado Caritas
 DIF Estatal Gestión Social del Estado Otro: _____

ANEXO E. ESTÁNDARES Y CURVAS DE CALIBRACIÓN

Tabla 7. Preparación de estándares de albúmina.

Concentración BSA ($\mu\text{g/mL}$)	Vol. de diluyente (μL)	Vol. de ampolleta de albúmina (μL)
0	200	0
15	198.5	1.5
25	197.5	2.5
35	196.5	3.5
50	195	5
75	192.5	7.5
100	190	10
125	187.5	12.5
150	185	15

Tabla 8. Curva estándar de GSH.

Sol. amortiguadora Tris/EDTA (μL)	Sol. madre de GSH (μL)	Metanol (μL)	DTNB (μL)	Conc. final de GSH (μL)
100	0	120	80	0
100	10	110	80	10
100	20	100	80	20
100	30	90	80	30
100	40	80	80	40
100	50	70	80	50
100	60	60	80	60
100	70	50	80	70

Tabla 9. Preparación de estándares para TNF- α .

Vial	Vol. de sol. blanco (μL)	Vol. de estándar TNF- α (μL)	Suero inespecífico de ratón (μL)	Conc. final de TNF- α (pg/mL)
1	950	50 μL del estándar	25	250

2	500	500 μ L del vial 1	25	125
3	500	500 μ L del vial 2	25	62.5
4	500	500 μ L del vial 3	25	31.3
5	500	500 μ L del vial 4	25	15.6
6	500	500 μ L del vial 5	25	7.8
7	500	500 μ L del vial 6	25	3.9
8	500	0	25	0

Tabla 10. Curva de calibración FRAP.

Concentración FRAP (μ L/mL)	Sol. madre 170 μ g/mL (μ L)	Agua destilada (μ L)	FRAP (μ L)
0	0	60	240
5	1.5	58.5	240
10	3.8	56.2	240
15	5.3	54.7	240
20	6.8	53.2	240
25	9.0	51	240
30	10.5	49.5	240

Tabla 11. Curva de calibración DPPH.

Concentración DPPH (μ L/mL)	Agua destilada (μ L)	Sol. madre (μ L)	DPPH (μ L)
0	20	0	280
8.8	18.2	1.8 (Sol. madre 100)	280
17.6	16.5	3.5 (Sol. madre 100)	280
44	11	8.8 (Sol. madre 100)	280
88	2	17.6 (Sol. madre 100)	280
132	15	5.3 (Sol. madre 500)	280
176	13	7.0 (Sol. madre 500)	280

ANEXO F. ECUACIONES LINEALES

1. Ecuación lineal para cuantificación de proteína

$$y = mx + b$$

$$y = 0.0031x + 0.0092 \quad R^2 = 0.998$$

en dónde:

m = pendiente

b = ordenada al origen

x = concentración de la muestra

R² = coeficiente de determinación

2. Ecuación lineal para determinación de GSH

$$y = 0.0223x + 0.0154 \quad R^2 = 0.999$$

3. Ecuación lineal para la determinación de TNF- α

$$y = 0.0053x + 0.0376 \quad R^2 = 0.9985$$

4. Ecuación lineal para la determinación de FRAP

$$y = 0.038x - 0.0042 \quad R^2 = 0.9969$$

5. Ecuación lineal para la determinación de DPPH

$$y = -0.0063x - 0.035 \quad R^2 = 0.9921$$