

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud



**Caracterización de leucocitos en la leche humana temprana y sangre periférica de
madres con peso normal y madres con obesidad**

Presentado por:

Dr. Jorge Luis Moreno Vázquez

Tesis que para obtener el grado de:

Especialidad en Neonatología

Director de tesis:

**Dr. en Ciencias Clínicas Mario Rene
Alcorta García**

Codirector de tesis:

Dr. en Med. Víctor Javier Lara Díaz

**Monterrey, Nuevo León, México
Octubre, 2021**



Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud Programa Multicéntrico de Especialidades
Médicas

Los Integrantes del Comité aprueban la tesis de Jorge Luis Moreno Vázquez, que presenta
para cubrir el requisito parcial de obtención del grado de:

ESPECIALISTA EN NEONATOLOGÍA

Comité de Tesis

Dr. Mario René Alcorta García

Director de Comité

Dr. Víctor Arízaga Ballesteros

Sinodal

Dra. Marion Emilie Genevieve Brunck

Sinodal

Dr. Bronson Osorio Martínez

Director del programa de Neonatología

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi madre Luz Patricia y mi hermano Luis Ricardo agradecido infinitamente por su apoyo y amor, que me llevo a ser quien soy.

A Edith Blásquez por su infinito amor e interminable paciencia.

Agradecimiento

Agradezco especialmente al Dr. Bronson Osorio Martínez, maestro y mentor, por su apoyo incondicional y paciencia en estos tres años de residencia.

Agradezco muy especialmente al Dr. Víctor Javier Lara-Díaz, al Dr. Mario René Alcorta García a la Dra. Marion Genevieve por guiarme durante la residencia y su apoyo al realizar este trabajo.

Agradezco a todos los maestros del programa de neonatología, pero muy especialmente a la Dra. Dalia Rodríguez siendo un ejemplo que seguir durante toda la residencia.

Agradezco a mi compañera Angela Liliana Ruiz Barreto por su apoyo durante todos estos años de formación.

Agradezco a mis compañeros durante esta residencia: Gelacio Jiménez, Alan Montoya, Tania Moreno, Eduardo González, Jorge Martínez, Jency Cordova y Ramon Alanis.

Agradezco al equipo de Lactancia y enfermería del Hospital Regional Materno Infantil por toda la ayuda y facilidades brindadas en este proyecto.

Agradezco al equipo de biotecnología del ITESM, quienes tomaron el control del proceso y análisis de muestras y que, gracias a su experiencia en la materia, lograron obtener material de calidad con las muestras recolectadas.

Resumen

La celularidad de la leche humana se ha estudiado desde el siglo XVII, existiendo abundante información de las características de estas células, su relación y porcentaje, así como el aumento de éstas, dependiendo de las características clínicas del recién nacido y de la madre. Con el advenimiento de nuevas tecnologías como la citometría de flujo, ha sido posible identificar los diferentes tipos de células de la leche materna de manera más precisa.

Nuestro estudio se basa en la diferenciación por medio de citometría de flujo de los leucocitos presentes en la leche materna; se tomaron muestras de sangre periférica maternas concomitantes con muestras de leche, en población sana y con índice de masa corporal de 18.5-24.5, considerado como control y en una población con índice de masa corporal superior a 30, considerado como obesidad. Se ha descrito que la población que sufre de obesidad presenta disfunción mitocondrial e inducción de respuestas proinflamatorias, se teoriza que esto pudiera modificar a la población de leucocitos de la leche materna. El resultado mostró una diferencia importante entre la leche materna y la sangre de los mismos grupos, encontramos pocas diferencias entre la leche materna entre los grupos, sin embargo, en una revaloración de los datos y la complejidad de los neutrófilos, las células B mostraron hallazgos de interés. La evaluación de los efectos inmunológicos sobre los recién nacidos por la leche materna, que pudieran modificar su eficacia como factor protector sobre la incidencia de infecciones u otras reacciones inmunes, se tendrá que estudiar posteriormente.

Glosario

µg	Microgramos
µL	Microlitros
AAP	Academia Americana de Pediatría
°C	Grados centígrados
CD 294	Receptor 2 de prostaglandina D2
CD 36	Translocasa de ácido graso o miembro 3 del receptor eliminador de clase B
CD 45	Receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo C
CD16	Proteína transmembrana FcγRIII
CD2	Antígeno de superficie celular T11 / Leu-5, LFA-2 o receptor LFA-3
CK18	Citoqueratina 18
cm	Centímetros
DE	Desviación estándar
ECN	Enterocolitis necrosante
FBS	Suero fetal bovino
FUM	Fecha de última menstruación
FSA-A	Área de dispersión hacia adelante
hMmSCs	Células progenitoras de la leche materna humana
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina A
IMC	Índice de masa corporal
MFI	Intensidad de fluorescencia media
mm	Milímetros
ng	Nanogramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer de solución salina con fosfato (por sus siglas en inglés)
RCF	Fuerza centrífuga relativa
RN	Recién nacido

SSA-A	Área de dispersión lateral
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
VD	Variable Dependiente
VI	Variable Independiente

Índice

Dedicatoria	3
Agradecimiento	4
Resumen	5
Glosario	6
Índice de tablas	11
Índice de figuras	12
Capítulo 1.- Planteamiento del problema.	13
Antecedentes	13
Pregunta de investigación	13
Hipótesis:	13
Objetivo general:.....	13
Objetivos secundarios:	14
Objetivos exploratorios:.....	14
Justificación	15
Alcance del estudio	16
Capítulo 2.- Marco Teórico.....	17
Beneficios de la lactancia	17
Desarrollo de la glándula mamaria	19
Anatomía de la glándula mamaria	19
Producción de leche	20
Tipos de leche	23
Células de la leche humana.....	23
Funciones de las células transferidas	25
Composición de la leche en condiciones agudas y crónicas.....	26

Sobrepeso y obesidad materna.....	26
Capítulo 3.- Metodología	29
Diseño del estudio.....	29
Población de estudio	29
Entorno.....	30
Período del Estudio.....	30
Selección de participantes.....	30
Criterios de Inclusión.....	30
Criterios de Exclusión.....	31
Criterios de Eliminación	32
Obtención de muestras.....	32
Definición operacional de las variables cuantitativas.....	33
Definición operacional de las variables cualitativas.....	34
Método de obtención de muestras y almacenamiento	36
Método Analítico	36
Adquisición de muestras	39
Determinación del tamaño muestral	40
Análisis estadístico	40
Aspectos Éticos y regulatorios.....	41
Capítulo 4.- Resultados	42
Granulocitos inmaduros.....	44
Eosinófilos	46
Basófilos	48
Neutrófilos	50

Células B.....	52
Células T citotóxicas y NK.....	54
Células T no citotóxicas.....	56
Monocitos no clásicos (CD16+).....	58
SSC-A.....	62
CD 2 y CD 294.....	64
CD 16.....	66
CD 19.....	68
CD 36.....	70
CD 45.....	71
Capítulo 5.- Análisis y discusión de resultados.....	75
Capítulo 6.- Conclusión.....	85
Sesgos potenciales y estrategias para evitarlos.....	86
Apéndice.....	88
Apéndice 2. Carta de aprobación del comité de ética de la Escuela de Medicina.....	89
Apéndice 3. Carta de aprobación de Enmienda del comité de ética de la Escuela de Medicina.....	90
Apéndice 4. Carta de aprobación de Enmienda del comité de investigación de la Escuela de Medicina.....	91
Apéndice 5. Constancia de registro de protocolo ante la Secretaría de salud de Nuevo León.....	92
Referencias.....	93
Curriculum.....	101

Índice de tablas

Tabla 1 Características clínicas maternas	42
Tabla 2 Características de las muestras sanguíneas y calostro	43
Tabla 3 Descripción estadística para granulocitos inmaduros	45
Tabla 4 Descripción estadística del total de granulocitos inmaduros por mililitro de calostro	45
Tabla 5 Descripción estadística de eosinófilos	47
Tabla 6 Descripción estadística del total de eosinófilos por mililitro de calostro	48
Tabla 7 Descripción estadística del total de eosinófilos por mililitro de calostro	49
Tabla 8 Descripción estadística del total de basófilos por mililitro de calostro	50
Tabla 9 Descripción estadística para neutrófilos	51
Tabla 10 Descripción del total de neutrófilos por mililitro de calostro	51
Tabla 11 Descripción estadística de las células B	52
Tabla 12 Descripción estadística de células B por mililitro en calostro	53
Tabla 13 Descripción estadística para las células citotóxicas T y NK	55
Tabla 14 Descripción estadística de las células T citotóxicas y NK por mililitro de calostro	56
Tabla 15 Descripción estadística de las células T no citotóxicas	57
Tabla 16 Descripción estadística de las células T no citotóxicas por mililitros de calostro	58
Tabla 17 Descripción estadística de los monocitos no clásicos	59
Tabla 18 Descripción estadística de monocitos no clásicos (CD16+) por mililitro de calostro	59
Tabla 19 Valores medios con DE para FSC-A en todas las poblaciones de leucocitos	62
Tabla 20 Valores medios con DE para SSC-A en todas las poblaciones de leucocitos	64
Tabla 21 Valor medio con DE para CD 2 y CD294	66
Tabla 22 Valores medios con DE para CD 16 en monocitos no clásicos, células T citotóxicas y NK y neutrófilos	68
Tabla 23 Medias y DE para CD 19 en células B	69
Tabla 24 Valores medios con DE para CD36 en monocitos clásicos y no clásicos	71
Tabla 25 Valores medios con DE para CD45 en todas las subpoblaciones de leucocitos para sangre periférica y calostro en cada grupo	74

Índice de figuras

Figura 1 Diferencia de linfocitos B en leche de calostro, superior en madres delgadas	54
Figura 2 DE para FSC-A en subpoblaciones de leucocitos en sangre (rojo) y calostro (azul)	61
Figura 3 Media y DE para SSC-A en todas las subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica (rojo) y calostro (azul)	63
Figura 4 Media con DE para CD2/CD 294 en sangre periférica (rojo) y calostro (azul)	65
Figura 5 media y DE para CD 16, para sangre periférica (rojo) y calostro (azul)	67
Figura 6 distribución media de CD 19 en linfocitos b en sangre periférica y calostro en conjunto, sin encontrar diferencias significativas	69
Figura 7. Media con DE para CD36 en monocitos no clásicos para sangre periférica (rojo) y calostro (azul).	70
Figura 8. Media con DE para CD45 en todas las subpoblaciones de leucocitos para sangre periférica (rojo) y calostro (azul).	72

Capítulo 1.- Planteamiento del problema.

Antecedentes

En México hay una alta prevalencia de mujeres que presentan obesidad y sobrepeso, además un gran número de mujeres embarazadas con sobrepeso corren mayor riesgo de desarrollar diabetes gestacional y preeclampsia (1,2). Se ha descrito que existe una correlación entre el padecimiento de estas enfermedades durante el transcurso del embarazo con el desarrollo fetal y morbilidad neonatal. La diferenciación de los factores inmunológicos, así como la celularidad leucocitaria de la leche materna dará pie a posibles futuros estudios que permitan esclarecer el valor clínico de estas diferencias.

Pregunta de investigación

¿Las poblaciones de leucocitos de la leche materna es diferente en las madres con obesidad y las madres con peso adecuado?

Hipótesis:

Las poblaciones de leucocitos de la leche materna son diferentes en las madres con obesidad y las madres con peso adecuado.

Objetivo general:

Caracterizar e identificar las diferencias de leucocitos en el grupo de madres con obesidad, y madres con peso adecuado considerado como grupo control.

El Objetivo Primario de la primera parte de este trabajo, consiste en establecer dos grupos de madres, uno de madres con obesidad y uno de madres delgadas que no cuenten con ninguna patología presente, previa o durante el embarazo, sin haber presentado infecciones durante el mismo, para posteriormente tomar muestras de leche y sangre periférica, para poder realizar una caracterización de estas.

Objetivos secundarios:

1. Se describió la población leucocitaria de la leche humana temprana y sangre periférica en madres con peso adecuado posterior a un embarazo a término.
2. Se describió la población leucocitaria de la leche humana temprana y sangre periférica en madres con obesidad.
3. Se determinó si existe diferencia en las poblaciones leucocitarias obtenidas, en cuanto a la proporción y la diversidad de éstas.
4. Se comparó las diferencias leucocitarias de las muestras de sangre periférica y leche de los grupos correspondientes

Objetivos exploratorios:

1. Se caracterizó los porcentajes de las poblaciones de leucocitos en leche materna temprana pertenecientes a los grupos estudiados.
2. Se caracterizó el porcentaje de la población de leucocitos en sangre periférica en los grupos estudiados.
3. Se compararon los resultados entre las diferentes muestras biológicas.

Justificación

No existen al momento, estudios en los cuales se haya descrito la población celular leucocitaria de la leche materna en mujeres con obesidad en el embarazo.

El presente estudio pretende determinar los componentes celulares leucocitaria y diferenciarlos en población de madre con obesidad sana y en madre con peso adecuado sanas, para posteriormente compararlos.

Alcance del estudio

Este trabajo se realizó en el Hospital Regional Materno Infantil, donde se atienden mujeres de la zona metropolitana de Monterrey, así como el resto de los municipios de Nuevo León. por lo que tiene una limitación geográfica a esa región. Los hallazgos no se pueden extrapolar a la población que está fuera del área descrita. Ya que es de los primeros estudios de su tipo, siendo este una investigación de tipo exploratoria, transversal y descriptiva. Va a tener la capacidad de originar nuevas hipótesis y preguntas de investigación a partir de los resultados obtenidos.

Capítulo 2.- Marco Teórico

Existe un importante cuerpo de evidencia las cuales han demostrado que la leche humana es el alimento de elección para todos los seres humanos durante su periodo de lactante, de especial importancia durante la vida neonatal. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Academia Americana de Pediatría (AAP) recomiendan el inicio de lactancia materna temprana, iniciándola primera alimentación en la sala de parto durante la primera hora de vida y continuarla de forma exclusiva por al menos 6 meses, y posteriormente se continua con la lactancia y posterior introducción de alimentos complementarios, los cuales deben ser ricos en hierro y variados. La AAP recomienda continuar con la lactancia por todo el primer año o más según el deseo de la madre y el niño, sin existir aun un límite de edad (3). Según el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), a lo largo del último año a nivel en todo el mundo, el 38% de los lactantes menores de 6 meses que habitan en territorios en vías de desarrollo son alimentados con leche materna exclusiva. En México la lactancia materna es todavía menor a la meta que recomienda la OMS, y desciende velozmente con la edad del lactante. La duración en promedio de alimentación al pecho materno en México es de aproximadamente 10 meses, solo el 14% de las madres que dan seno materno lo realizan de manera exclusiva. (4)

Beneficios de la lactancia

Según datos del UNICEF, si todos los lactantes se alimentaran con leche materna a partir la primera hora de vida, de forma exclusiva hasta los 6 meses de vida, y continuando hasta los

dos primeros años, se podría evitarían 800 mil defunciones infantiles por año. (5) La leche materna ofrece beneficios demostrados en lo que corresponde a nutrición, funcionalidad gastrointestinal, sistema inmune, y bienestar psicológico. diversos de los elementos de ésta, estimulan el desarrollo gastrointestinal y la motilidad, favoreciendo la maduración del tracto digestivo. Tiene además componentes protectores para reducir el riesgo de enterocolitis necrosante y otras infecciones. (6) La leche materna tiene una función antimicrobiana, debido a que tiene agentes antimicrobianos que persisten inclusive luego de la lactancia. Dichos agentes resisten a las enzimas digestivas, y funcionan como barrera a nivel de mucosas. Se conforman de proteínas: lactoferrina, Inmunoglobulina A (IgA) y lisozimas. Cuenta con lípidos, como por ejemplo ácidos grasos libres y monoglicéridos, que trabajan lisando virus, bacterias y protozoarios. (7) Los hidratos de carbono que contiene son oligosacáridos y glicoproteínas. Éstos se encargan de promover la colonización intestinal por Bifidobacteria y Lactobacillus. (8).

Comparada con la fórmula, se demostró que la leche materna aumenta la rapidez de vaciamiento gástrico. Tiene algunos beneficios específicos para los pacientes prematuros, como incremento de la actividad de lactasa intestinal, disminución de la permeabilidad intestinal, y disminuye la incidencia de enterocolitis necrosante (ECN). El impacto de cada una de estas sustancias reduce el riesgo de patologías a medida el recién nacido y el lactante se encuentre alimentado con ésta. (9) En países en vías de desarrollo la morbimortalidad es menor en los lactantes alimentados al seno materno (10).

Desarrollo de la glándula mamaria

La glándula mamaria en el ser humano es el único órgano que no tiene todos sus tejidos rudimentarios desde el momento del nacimiento. (11) Experimenta cambios relevantes a lo largo de la vida de la mujer, desde la menarca, embarazo, lactancia y al final de la vida la involución de la glándula. (8)

El esbozo mamario surge en la cuarta semana de gestación, una vez que el embrión mide aproximadamente 2.5 milímetros (mm) de longitud. luego se convierte en la línea mamaria en la semana 5 del embarazo y a la semana 6, empieza su desarrollo como glándula. Los conductos mamaros proliferan a lo largo de todo el desarrollo embrionario. El pezón se forma de la capa de ectodermo. A la decimosexta semana de gestación, la etapa de ramificación ha producido entre 15 a 25 líneas epiteliales que se convertirá en alveolos secretores. A las 28 semanas de gestación las hormonas placentarias acceden a la circulación fetal e inducen la canalización del tejido mamario. Los conductos lactíferos y sus ramas se desarrollan de la excrecencia hacia el lumen. Al término del embarazo ya hay entre cuatro y 18 conductos mamaros que conforman la glándula mamaria. (8)

Anatomía de la glándula mamaria

La glándula mamaria madura se halla en la fascia superficial, entre la segunda y sexta costillas y superficial al músculo pectoralis. Mide de 10 a 12 centímetros (cm) de diámetro. El grosor central de la glándula es de 5 a 7 centímetros. En la etapa no gestante tiene un peso de alrededor de 200 gramos, a lo largo del embarazo se incrementa a 400-600 gramos y en la lactancia hasta 800 gramos. (11) La piel de la glándula tiene el pezón y la areola. La piel que

cubre la glándula es delgada y flexible. El pezón es una elevación cónica de centro de la areola. Contiene fibras de músculo liso y rico en terminaciones sensitivas y fibras de dolor. Tiene una área verrugosa y glándulas sebáceas y apocrinas. En la superficie de la areola se encuentran las glándulas de Montgomery, las cuales presentan hipertrofia a lo largo el embarazo y la lactancia. Las glándulas de Montgomery están encargadas de secretar un material sebáceo, cuya función lubricar el pezón y la areola, a medida que el bebé succiona. Cada pezón tiene de 4 a 18 conductos lactíferos, de los cuales 5 a 8 son conductos principales. (12) Dichos conductos terminan como orificios en la punta del pezón, por los cuales sale la leche. La irrigación sanguínea que llega a la glándula mamaria es a partir de ramas de las arterias intercostales y ramas perforantes de la arteria torácica interna. La principal fuente de irrigación nace de la arteria mamaria interna y de la torácica lateral. El drenaje linfático llega a los ganglios axilares y paraesternales, siguiendo el recorrido de la arteria torácica. (8)

Producción de leche

Fisiológicamente la lactancia se considera como la finalización del ciclo de la reproducción. El humano se encuentra entre los mamíferos más inmaduros al momento del nacimiento. La leche materna provee de los nutrientes más apropiados para el lactante. A lo largo del embarazo, la glándula mamaria se prepara para lograr dar los nutrientes al lactante. A partir de la semana 16, el tejido mamario se encuentra en condiciones para llevar a cabo una lactancia completa. El control hormonal de la lactancia se puede describir con cinco procesos en la glándula mamaria. En orden cronológico, estos procesos son: embriogénesis, mamogénesis, crecimiento mamario, lactogénesis (iniciación de la secreción), lactancia (secreción completa) e involución. (8)

La lactogénesis tiene dos etapas. La etapa I se lleva a cabo durante el embarazo y finaliza cuando la glándula está lo suficientemente diferenciada para secretar leche. Las concentraciones elevadas de progesterona evitan que ocurra secreción de leche antes de tiempo. La etapa II consiste en el inicio de secreción copiosa de leche, que ocurre posterior al parto y alumbramiento de la placenta. Los niveles de progesterona disminuyen abruptamente en los primeros 4 días por un factor de hasta 10 veces menos. (13)

Durante el embarazo las hormonas progesterona, prolactina y posiblemente lactógeno placentario son las responsables del desarrollo del alveolo. La progesterona es la hormona principal que inhibe la producción de leche. Durante el embarazo los niveles de prolactina se mantienen superiores a 200 ng/mL. Los niveles de prolactina elevados de manera sostenida, y el descenso de la progesterona son necesarios para el comienzo de la etapa II. La placenta es la fuente principal de progesterona durante el embarazo, y al alumbrar la placenta, los niveles de progesterona bajan súbitamente. (8)

Lactogénesis III: ocurre y continúa solo con la lactancia materna por la producción de leche (galactopoyesis). Está bajo control autocrino, controlada por la remoción de leche de la glándula mamaria. Se ha descrito que la falla primaria en la lactancia ocurre en el 1 a 5% de las mujeres. Esto es debido a insuficiencia del tejido glandular y ausencia de crecimiento mamario durante el embarazo. Aunque no es común, es importante conocerlo y reconocer que, en este número de madres, no obstante, una adecuada asesoría y esfuerzo, no se podrá llevar a cabo la lactancia. (14)

Aproximadamente a las 36 horas posparto en multíparas y las 72 horas en primíparas, ocurre un incremento de diez veces del volumen de leche producido, el cual aumenta de 50 a 500

mL al día. A este aumento se le conoce como la “bajada de leche”. (8) La producción de leche en el primer día de lactancia provee de 2 a 7 mililitros por cada alimentación en madres sanas, durante el segundo día de lactancia el volumen aumenta, siendo 5 a 15 mililitros por cada alimentación, siendo estas de 8 a 12 al día, el tercer día de alimentación la producción aumenta importantemente de 10 a 20 mililitros por alimentación. (20)

Además de la prolactina, la insulina y los glucocorticoides son esenciales para la síntesis de leche. En mujeres que cursan con retención de placenta, operación cesárea, diabetes o estrés durante el nacimiento se ha observado lactogénesis retrasada. En las mujeres con diabetes durante el embarazo, son varios los factores que contribuyen a una lactogénesis retrasada, (15) entre ellos se incluyen: obesidad previa al embarazo, edad materna avanzada, y uso de insulina. (16) Cuando la extracción de leche no comienza en las primeras 72 horas, los cambios en la composición de la leche asociados con la lactogénesis ocurren de forma reversa, y la probabilidad de que exista una lactancia exitosa disminuye. (17)

Las características principales de la leche inicial son concentraciones iniciales elevadas de sodio, cloruro, inmunoglobulina y lactoferrina, con poca lactosa y nula caseína. En el primer día se puede llegar a producir hasta 100 mililitros de leche y para el día 5, ya se producen entre 500 y 750 mililitros de leche. Este aumento del volumen de leche es acompañado de una disminución en la concentración de sodio y cloruro en la leche, así como un incremento en la lactosa. Los cambios en las características de la leche durante la lactancia ocurren gracias a los cambios en la permeabilidad de las vías paracelulares. La producción de lactosa es la que determina la producción de leche. (8)

Tipos de leche

Calostro (1 a 5 días): Se produce en cantidades pequeñas y es rico en componentes inmunológicos como inmunoglobulina A, lactoferrina, leucocitos y factores del desarrollo, como factor de crecimiento epidérmico. Contiene una baja cantidad de lactosa, potasio y calcio y niveles mayores de sodio, cloro y magnesio. (18) Leche de transición (6 a 15 días): su principal función es nutricional. Aumenta la cantidad de lactosa y potasio, disminuye la concentración de sodio. Leche madura (15 a 19 días): su función continúa siendo nutricional pero su composición permanece estable, salvo pequeñas variaciones. (19)

Células de la leche humana

El primero en describir las partículas en la leche materna fue Anthony Van Leewenhoek (1632-1723) sin embargo su naturaleza celular no fue clara. En 1950 Papanicolaou describieron las características de las células epiteliales en secreción de mujeres lactantes y no lactantes. Smith Goldman y colegas describieron la presencia de leucocitos como el tipo dominante celular, observación que se confirmó posteriormente. (20)

Desde su descubrimiento, estos leucocitos se han estudiado intensamente por su valor inmunológico en el recién nacido. El uso de tecnologías avanzadas en biología molecular, microscopia fluorescente y citometría de flujo han permitido estudiar los factores que pueden influenciar en la estructura e importancia de estas células para el recién nacido. (20)

La leche materna es dinámica, dependiendo de las necesidades del recién nacido y de les estado de la glándula mamaria. Los leucocitos son componentes bioactivos de

inmunocompetencia y provee inmunidad para proteger al infante de infecciones y ayudan a la recuperación de infecciones. Dentro de estos leucocitos se observan granulocitos (40-50%), linfocitos (5-10%), monocitos y macrófagos (40-50%). De estas células, los linfocitos T representan más del 83% mientras que las células B del 1 al 6%. Es importante mencionar que la gran mayoría de estos linfocitos están activados (CD45RO+). Se ha demostrado recientemente que la leche materna responde con el aumento de los leucocitos a infecciones maternas observada en mastitis o infecciones a otros órganos. Interesantemente, aun cuando la madre se encuentra asintomática a alguna infección, cuando el infante presenta una infección el número de leucocitos también aumenta. (20)

Las células más abundantes en la leche materna son las células del epitelio luminal CK18+, y lactocitos caseína positivos, que sintetizan proteínas de la leche. Estas células constituyen el 98% de las células contenidas en la leche. El 2% restante de las células, incluye una variedad muy amplia de células, incluyendo leucocitos y células progenitoras, que se han designado células progenitoras de la leche materna humana (hMmSCs por sus siglas en inglés). Los leucocitos llegan a la leche materna por la vía paracelular, en un proceso llamado diapédesis (21) El calostro contiene hasta 146,000 células por mililitro (ml), las cuales disminuyen a 27,500 células/mL en la leche de transición y 23,650 células/ml en la leche madura. Los leucocitos constituyen hasta el 20% de las células del calostro, mientras que en la leche madura son menos del 2% de las células. (22). En modelos animales los leucocitos de la leche materna sobreviven el intestino neonatal y proveen soporte inmunológico al lactante durante el periodo que recibe alimentación con leche materna. (23) Algunos tipos de

células son capaces de viajar desde la leche, a través del tracto gastrointestinal del bebé, y llegar a sitios lejanos, como el bazo, hígado y nódulos linfáticos. (21).

Funciones de las células transferidas

La transferencia de células de la leche materna puede ocurrir porque las uniones de brecha en las células epiteliales del intestino son sueltas, y la actividad enzimática es limitada después del nacimiento (26), y el estómago no es tan ácido debido a la presencia de líquido amniótico. (27) Los estudios en ratones muestran que las células de la leche se pueden transferir a las crías lactantes. Más del 80% sobrevive la digestión del estómago, y algunas de estas células, principalmente las células CD4 + y CD8 +, se adhieren al intestino. Otras células se translocan desde el intestino y migran temporalmente a órganos como el timo y el bazo. (28) Las células maternas están presentes en el cerebro de los cachorros amamantados, donde se diferencian en células neuronales y gliales, en un proceso de microquimerismo. Las consecuencias a largo plazo de esta transferencia materna aún se desconocen. (29) Además, la lactancia materna también podría ayudar a preparar el sistema inmunológico para desarrollar tolerancia a los antígenos alimentarios (30).

En un estudio de la población de leucocitos en leche materna a 61 madres, donde se observó que la leche materna de madres que desarrollaron alergia a la proteína de leche de vaca, presentaron una cantidad significativamente menor de macrófagos, así como una proporción mayor de neutrófilos. En este mismo estudio se observó que solamente las madres con hijos que desarrollaban alergia a la proteína de leche de vaca tenían más de 1% de eosinófilos en la leche materna, sugiriendo una relación entre los componentes celulares de la leche materna y el posterior desarrollo de alergias alimenticias. (44) El valor clínico

de los neutrófilos, así como de los granulocitos inmaduros, aún no está completamente dilucidado, sin embargo, en estudios ex vivo, se ha observado que cuentan con capacidad de opsonización y se ha asociado un conteo bajo en leche materna con el posterior desarrollo de ECN. (45)

Composición de la leche en condiciones agudas y crónicas.

Muchos factores maternos, infantiles y fisiológicos influyen en la composición de la leche materna. Algunos son las variaciones diarias, la etapa de lactancia y el momento de la lactancia (leche final versus primera), mientras que otros como la nutrición materna y la composición corporal no están tan bien caracterizados. (31) Pocos estudios se han centrado en los efectos del estado nutricional de mujeres sobre la composición inmunológica de su leche.

Las proporciones de leucocitos en la leche materna pueden aumentar hasta un 93,6% durante una fase aguda de una infección materna. (32) La infección por Zika durante el embarazo, en comparación con madres que no estaban infectadas, lo que conduce a un menor contenido de IL-10 (medias de 1 y 4 pg / mL, respectivamente), y mayor contenido de IL-6 en la leche (medias de 200 y <50 pg / mL, respectivamente), incluso cuando no hubo ningún proceso infeccioso durante la lactancia. (33)

Sobrepeso y obesidad materna

El sobrepeso y la obesidad son afecciones con acumulación anormal o excesiva de grasa que pueden perjudicar la salud. El índice de masa corporal (IMC), es un índice simple de peso para la altura (kg / m^2), se utiliza como una guía aproximada comúnmente utilizada para

clasificar estas condiciones. En adultos, la organización mundial de la salud define el sobrepeso cuando el IMC es mayor o igual a 25 y para obesidad un IMC igual o superior a 30, con tres niveles de obesidad. En 2016, más de 1,900 millones de adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso en todo el mundo, y Entre estos adultos, más de 650 millones eran obesos, lo que supone el 39%. (34) Tener sobrepeso y obesidad representa alrededor del 13% de la población adulta mundial. En el mismo año, en México, hubo una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad del 71,2%, con mayor prevalencia entre las mujeres. La obesidad afectó al 38,6% de las mujeres y el 27,7% de los hombres, mientras que el sobrepeso afectó al 37,0% de las mujeres y al 41,7% de los hombres. (35)

La principal causa de obesidad y sobrepeso es un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y calorías gastadas, como resultado de la mayor ingesta de alimentos densos en energía que son ricos en grasa, y una disminución de la actividad física debido a los hábitos cada vez más sedentarios. Las consecuencias comunes para la salud del sobrepeso y la obesidad son enfermedades cardiovasculares, diabetes, trastornos musculoesqueléticos y aumento del riesgo de cáncer, todos correlacionados con el aumento del IMC. Además, la obesidad infantil se asocia con una mayor probabilidad de muerte prematura y discapacidad en la edad adulta, con otras consecuencias específicas como hipertensión, resistencia a la insulina y efectos fisiológicos (34).

Los mecanismos de alteraciones metabólicas que explican la fisiopatología de la obesidad son desequilibrios crónicos de energía, alto aumento de adipocitos, hipoxia local, apoptosis de adipocitos, aumento de especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo del retículo endoplásmico, disfunción mitocondrial e inducción de respuestas proinflamatorias. (36) Las

células inmunes incrustadas en el tejido adiposo también sufren alteraciones. Aumentan los macrófagos como respuesta del entorno proinflamatorio y prooxidativo, que recluta más de estas células. Algunos monocitos son atraídos por el tejido, por lo que proliferan los macrófagos locales, con el fenotipo M1 (el clásico o proinflamatorio, en lugar del M2, que está presente en las enfermedades de personas no obesas y tiene función antiinflamatoria), secretando así IL-1, IL-6 y TNF. Asimismo, la obesidad aumenta la llegada de T citotóxicos y Th (helpers en inglés), con secreción de IFN-gamma, IL2 y TNF-alfa, que estimula la producción de linfocitos innatos tipo 2 y reguladores T. (37) Finalmente, la acumulación de ácidos grasos en los adipocitos origina daño celular, activando cascadas proinflamatorias (38).

Por último, estudios realizados en madres con sobrepeso y obesidad han mostrado una menor respuesta hormonal, por parte de la prolactina, en respuesta a la succión del recién nacido al compararlas con madres que presentan peso adecuado. Dicho efecto se observa dentro de los primeros 7 días posterior al parto (39).

Capítulo 3.- Metodología

Diseño del estudio

Estudio observacional, transversal y comparativo

Población de estudio

Dos grupos de madres, de las cuales se recolectaron un total de 22 muestras de leche y sangre periférica por grupo (44 muestras de leche materna y 44 muestras de sangre periférica totales).

El primer grupo, conformado por madres adultas, con edad entre 21 y 34 años, con índice de masa corporal entre 18.5 y 24.9, con embarazo a término (más de 37 semanas) sin presentar infecciones de vías urinarias o cervicovaginitis 3 meses previas al parto, sin diabetes gestacional, hipertensión arterial o preeclampsia, con embarazo a término, con control prenatal adecuado y que culminen su embarazo en Hospital Regional Materno Infantil.

El segundo grupo, incluyó madres adultas, con edad entre 21 y 34 años, con índice de masa corporal mayor a 30, con embarazo a término (más de 37 semanas), sin presentar infecciones de vías urinarias o cervicovaginitis 3 meses previas al parto, sin diabetes gestacional, hipertensión arterial o preeclampsia, con embarazo a término, con control prenatal adecuado y que culminen su embarazo en Hospital Regional Materno Infantil.

Entorno

Hospital Regional Materno-Infantil, OPD de los Servicios de Salud del Estado de Nuevo León, Ciudad Guadalupe, Nuevo León México.

Período del Estudio

Reclutamiento de pacientes entre febrero 2019 y mayo 2021.

Selección de participantes

Con el fin de controlar los efectos derivados del medio ambiente, se incluyeron exclusivamente madres mexicanas, con residencia los últimos doce meses previos al embarazo en la zona metropolitana de Monterrey (compuesta por los municipios de Apodaca, García, Escobedo, Guadalupe, Juárez; Monterrey, San Nicolás, San Pedro y Santa Catarina).

Criterios de Inclusión

1. Cumplir las características de uno solo de los grupos de estudio.
2. Que acepten la invitación a participar en el estudio, y firmen el documento de consentimiento informado, con sus anexos.
3. Con domicilio comprobado con documento oficial en la zona metropolitana de Monterrey (Credencial del Instituto Nacional Electoral o Licencia de manejo).

Criterios de Exclusión

1. Haber recibido antibióticos durante los 3 meses previos al ingreso al hospital; o haber estado sujetas a tratamientos antibióticos prolongados por más de 3 meses en cualquier momento previo al nacimiento.
2. Haber recibido tratamiento con esteroides en dosis inmunosupresoras o inmunomoduladoras (No incluye a la administración de agentes de maduración pulmonar)
3. Antecedente de cirugía bariátrica.
4. Historia de trastornos de la alimentación (Anorexia nerviosa, bulimia, comedora compulsiva, etc.).
5. Haber recibido tratamiento antineoplásico de cualquier tipo durante su vida.
6. Antecedente de haber tenido una cirugía complicada en los 12 meses previos al nacimiento de interés.
7. No tener una fecha de última menstruación (FUM) confiable.
8. Haber recibido antagonistas de H₂-histamina y/o inhibidores de bomba de protones.
9. Haber padecido diarrea en o durante las dos semanas previas al parto.
10. Historia de uso de medicamentos biológicos (anticuerpos monoclonales).
11. Historia de cualquier enfermedad crónica no transmisible diferente a obesidad (Enfermedades autoinmunes, insuficiencia renal, hipertensión arterial, etc.) que requiera tratamiento, aunque no lo haya recibido.

Criterios de Eliminación

1. Recibir antibióticos por vía parenteral por más de 24 horas después del nacimiento.
2. Que requieran cuidado intensivo posterior al nacimiento.
3. Cualquier otra causa que impida la obtención de la muestra de leche.
4. Aquellas muestras de leche materna que una vez obtenidas, no tengan adecuada calidad para el procesamiento y conteo celular.

Obtención de muestras

Muestras biológicas obtenidas maternas:

1. Sangre materna
2. Leche materna temprana

Definición operacional de las variables cuantitativas

Variables cuantitativas (sig. Página)

Definición operacional de las variables cuantitativas

Variable	Definición operacional
Edad materna	Años cumplidos desde el nacimiento
Fecha de nacimiento del RN	Día de nacimiento del bebe, expresada con formato día/mes/año
Volumen de leche recolectado	Cantidad de muestra de leche obtenida en microlitros.
Fecha de extracción de leche	Día en que se realizó, la extracción de leche materna, el formato DD/MM/aa.
Gesta	Número de embarazos, incluyendo el actual.
Partos previos	Número de nacimientos vaginales previos, sin contar el actual
Cesáreas	Número de nacimientos quirúrgicos abdominales previos, sin contar el actual
Abortos previos	Número de muertes intrauterinas previas
Índice de masa corporal	Medidas de asociación entre el peso y la talla del individuo, expresada en kg/m ² , calculando al dividir el peso en kilogramos, entre la talla en metros elevada al cuadrado. Número racional redondeado a la décima más cercana.

FUM	Fecha en que presentó el primer día de la menstruación. En el formato dd/mm/aa
Edad gestacional	Días transcurridos desde la fecha de última menstruación hasta la fecha de nacimiento. Puede ser en días enteros o convertido a semana y días.
Ruptura de membranas	Diferencia de tiempo desde que se presenta pérdida de la integridad de la bolsa amniótica con salida de líquido al exterior, hasta el momento del nacimiento del bebé. En horas cumplidas
Peso del RN	Medida del recién nacido en gramos
Talla del RN	Longitud del recién nacido en centímetros
Perímetro cefálico del RN	Diámetro de la cabeza del recién nacido en centímetros

Definición operacional de las variables cualitativas

Variable	Definición operacional
Tipo de leche	Especificar si la muestra de láctea recolectada corresponde a calostro, leche de transición o leche madura
Consumo de tabaco	Numero de cigarrillos antes o durante el embarazo. Si o no.

Consumo de alcohol	Ingesta de productos alcohólicos antes o durante el embarazo. Si o no.
Consumo de drogas	Ingesta de sustancias psicoactivas recreativas antes o durante el embarazo. Si o no.
Antecedentes Patológicos	Tiene alguna enfermedad diferente a la diabetes mellitus gestacional, preeclampsia u obesidad. Sí o no, especificar en caso de respuesta afirmativa
Estado civil	Situación social de la madre al momento de la entrevista. Soltera, casada, unión libre, viuda o divorciada.
Infección de vías urinarias	Presentó evento inflamatorio infeccioso en uretra o vejiga durante el embarazo. Sí o no.
Cervicovaginitis	Presentó evento infeccioso en canal vaginal o cervical durante el embarazo. Sí o no
Antibióticos 3 meses previos	Consumo de medicamentos especializados en el tratamiento de infecciones en los 3 meses previos al Nacimiento, sin contar los administrados durante el periodo intraparto. Sí o no.
Trabajo de parto	Contracciones uterinas de parto. Sí o no.
Vía de nacimiento	Modo por la que se obtuvo el producto. Parto o cesárea
Cesárea de urgencia	Extracción quirúrgica del feto se tuvo que realizar en condiciones de urgencia, debido a alguna situación que comprometía la seguridad del feto o la madre. Si o no.

Control prenatal adecuado	La madre acudió a consultar con médico general o médico especialista para valorar evolución del embarazo, definido como 5 o más consultas prenatales. Sí o no.
Sexo del RN	Recién nacido. Masculino, femenino o indefinido.
Embarazo a término	Gestación que llegó a término, definido como una duración mayor o igual a 259 días (37 semanas). Sí o no.

Método de obtención de muestras y almacenamiento

Si la paciente cumplía con los criterios de inclusión, previa entrega de solicitud de consentimiento informado, se procedía a la toma de muestra de sangre materna, posteriormente se toman las muestras de calostro o leche temprana, éstas fueron colectadas de manera manual de cada pecho bajo la supervisión del equipo médico para después mantenerlas en refrigeración a 4 °C en refrigerador de Hospital materno infantil, posteriormente transportada en hielera a 4 °C por el equipo de biotecnología para su proceso en laboratorio central del Tecnológico de Monterrey (Campus Garza Sada) para su estudio.

Método Analítico

Se utilizaron entre 700 µL y 1000 µL de calostro para el enriquecimiento celular. Las muestras fueron transferidas a un tubo de 1,7 ml de polipropileno de micro centrifugación. La leche restante estaba etiquetada y congelada a -20 ° C. Las muestras se centrifugaron a 400 de fuerza centrífuga relativa (rcf) durante 15 minutos a 4 ° C. El sobrenadante (capa de grasa y leche desnatada) se transfirió a otro tubo de polipropileno de 1.7 ml y se almacenó

en -20 ° C para análisis de citocinas. El sedimento celular se lavó dos veces en las mismas condiciones previas re-suspendiendolo en 1000 µL de buffer de solución salina con fosfato (PBS) (catálogo Gibco® 2053135) suplementado con 2% de suero fetal bovino (FBS). Después del último lavado, el sedimento se re-suspendió en 1000 µL de PBS + FBS al 2%, y Se usaron 10 µl teñido, usando una solución de azul tripán al 0.4% para el recuento con un hemocitómetro.

Las muestras se mantuvieron en hielo hasta que se tiñeron con anticuerpos para citometría de flujo. Entre 0.2 y 1x10⁶ células se utilizaron para la tinción y se mantuvo el mismo número de células como control sin teñir. En aquellas muestras con menos de 10⁶ células, el número de células disponible se tiñó con el volumen equivalente de anticuerpos para 1x10⁶ células, de acuerdo con los siguientes pasos:

Las células se transfirieron a un tubo de polipropileno de microcentrífuga de 1,7 ml y se centrifugaron a 400 rcf durante 5 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en la mezcla maestra de anticuerpos, preparada con 1x PBS + 2% FBS + anticuerpos, y luego se incubó durante 30 minutos en hielo, cubierto de luz directa. La mezcla maestra se preparó con los volúmenes titulados de los siguientes anticuerpos: anticuerpo de ratón anti-CD2-APC humano (BD® cat. 560642), anticuerpo de ratón anti-CD16-APC-H7 humano (BD® cat. 560195), anti-CD19-V450 humano de ratón (BD® cat.560353), CD36-PE antihumano de ratón (BD® cat. 555455), CD45-V500 antihumano de ratón (BD® gato. 560777) y anti-CD294-Alexa Fluor 647 humano de rata (BD® cat. 558042). El volumen final para teñir 10⁶ células fue de 100 µl usando PBS + FBS al 2%.

Se agregaron 900 μL de PBS + FBS al 2% después de la incubación y las muestras se centrifugaron como antes. El sobrenadante se descartó y el sedimento se re-suspendió en 90 μL de PBS + FBS al 2%. 10 μL de yoduro de propidio (catálogo BD® 556463, a 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$) por 10^6 células (según el protocolo del fabricante) se agregaron 10 minutos antes de analizar con el citómetro de flujo. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta su análisis. Se agregaron inmediatamente 200 μL de PBS + FBS al 2% antes de ejecutar el citómetro de flujo.

La sangre periférica se procesó directamente utilizando alícuotas de 50 μL . Las alícuotas se transfirieron a tubos de microcentrífuga de polipropileno de 1,7 μL y los anticuerpos (mismos que se describen anteriormente) se añadidos directamente a las alícuotas y mezclado suavemente. La incubación se realizó durante 30 minutos en hielo, cubierto de luz directa. Luego, tanto las muestras teñidas como las no teñidas se lisaron usando 450 μL de 1x de cloruro de amonio como buffer de lisis, incubando a temperatura ambiente, cubierto de luz directa. Después de 10 minutos de incubación, se añadió 1 mL de PBS + FBS al 2% y se centrifugaron las muestras a 400 rcf durante 10 minutos a 4 ° C. Los sedimentos se re-suspendieron en 95 μL de PBS + 2% de FBS + 5 μL de solución de yoduro de propidio. Las muestras se pusieron en hielo durante 10 minutos y 200 μL de PBS + FBS al 2% se agregaron antes de analizar en un citómetro de flujo.

Para los controles de compensación de yoduro de propidio, se pusieron 50 μL de sangre periférica durante 5 minutos a 60 ° C, luego se agregaron 50 μL de sangre periférica fresca y se realizó la lisis usando 900 μL de 1x cloruro de amonio como buffer de lisis y procesado como se describe anteriormente. Después de 10 minutos de incubación, Se agregaron 500 μL

de PBS + FBS al 2% y las muestras se centrifugaron a 400 rcf durante 10 minutos a 4 ° C. Los sedimentos se re-suspendieron en 95 µl de PBS + 2% de FBS + 5 µl de solución de yoduro de propidio. 200 µL de PBS + FBS al 2% se añadieron inmediatamente antes de la lectura en el citómetro de flujo. El restante de la sangre periférica completa de cada muestra (entre 1 y 3,5 ml) se centrifugó a 1000 rcf durante 10 minutos a temperatura ambiente. El suero se dividió en alícuotas de 200 µL, almacenando entre 400 µL y 1 mL de cada muestra a -20 ° C.

Adquisición de muestras

Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo BD® FACSCelesta con software BD® FACSDiva 8.0. Los controles de compensación se prepararon con Perlas de compensación (BD® Anti-mouse Ig, catálogo de compensación de K Neg Control 552843, lote 9233251), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los controles de tinción simple se preparan con una gota de perlas positivas y una gota de perlas negativas, resuspendidas en 200 µL de 1x PBS + 2% FBS, y el volumen titulado de anticuerpo para 10⁶ células. Después de 30 minutos de incubación, se agrega 1 mL de 1x PBS + 2% FBS a cada tubo manchado. Los tubos se centrifugan a 200 rcf durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sedimento se resuspende en 200 µl de 1x PBS + 2% de FBS. Para el control negativo, una gota de negativo las perlas se resuspenden en 200 µl de 1x PBS + 2% de FBS.

30000 eventos únicos de sangre periférica y 50000 eventos de células enriquecidas con calostro fueron registrados de cada muestra, con el umbral de eventos ajustado en 35000 para sangre periférica y 28000 para calostro. Se realizó un análisis adicional de los archivos resultantes utilizando FlowJo® versión 10

Determinación del tamaño muestral

Dado que se realizará un estudio observacional, transversal y comparativo sin antecedente en nuestro país, y en base a los recursos disponibles, planteamos un estudio cuyo tamaño muestral es definido a conveniencia, de casos consecutivos, no probabilístico y no aleatorizado.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con Minitab 19. Para todos ellos, α se consideró en 0,05. Primero se realizó una prueba de normalidad (Ryan-Joiner) para conocer la distribución de los datos. De aquellos parámetros con distribución normal (valor de $p > 0,05$), se realizaron pruebas t de dos muestras. De aquellos parámetros sin distribución normal (valor de $P \leq 0.05$), se realizó la prueba de Mann-Whitney.

Se realizaron cuatro tipos de comparaciones: comparación de sangre periférica con calostro de madres delgadas, comparación de sangre periférica con calostro de madres con obesidad, sangre periférica sangre de madre delgada contra sangre periférica de madres con obesidad y calostro de madres delgadas contra el calostro de madres con obesidad.

Finalmente, todos los gráficos de cada parámetro se realizaron utilizando Prism - Graphpad. Dos tipos de gráficos se realizaron para frecuencias relativas de leucocitos en sangre periférica y calostro de ambos grupos: un diagrama de puntos que muestra la media y la desviación estándar, y una comparación por pares que vincula la sangre periférica y calostro de cada madre donante. Para los parámetros celulares y los fluorocromos, los gráficos de barras fueron hecho utilizando la intensidad de fluorescencia media (MFI),

incluida la DE. Estos gráficos de barras se realizaron combinando datos de ambos grupos ya que no se encontraron diferencias importantes entre los grupos.

Aspectos Éticos y regulatorios

Este protocolo se diseñó de acuerdo con las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y los acuerdos de Buenas Prácticas Clínicas de la ICH. Además, se apega a lo estipulado por la Ley general de Salud en materia de Investigación para la Salud de los Estados Unidos Mexicanos, y a los lineamientos publicados acerca del Formato de Consentimiento Informado. El resguardo de las muestras biológicas se hizo bajo la premisa garantizada de anonimato, ya que las muestras sólo fueron identificadas por un código alfanumérico. Las muestras fueron utilizadas exclusivamente para los propósitos declarados en este estudio.

Capítulo 4.- Resultados

La única diferencia poblacional entre los grupos de estudio estadísticamente significativa fue el índice de masa corporal entre el grupo control y grupo de estudio, resultado tal que era de esperarse, en el resto de las características demográficas no hubo significancia estadística. (tabla 1)

Tabla 1
Características clínicas maternas

Características clínicas	Valor	Madres delgadas (media ± DE [rango])	Madres con obesidad (media ± DE [rango])	P valor
Índice de masa corporal	Kg/m ²	23.7±1.49 [20-25]	33.5±3.67 [30-42]	<0.0001
Edad gestacional	Semanas	39.2±0.98 [37-41]	38.6±1.08 [37-41]	0.204
Modo de Nacimiento	vaginal	15	15	N/A
	cesárea	7	7	N/A
Genero del recién nacido	masculino	12	14	N/A
	femenino	10	8	N/A

Nota: Se encontró una diferencia significativa en el índice de masa corporal con una P <0.0001

La tabla 2 muestra los volúmenes medios obtenidos y DE de sangre periférica y calostro de madres delgadas y madres con obesidad. También contiene la media y la DE de las células enriquecidas de calostro, expresadas en células por mL, y los porcentajes con DE de células vivas y eventos CD45 + registrados en el flujo citómetro. En promedio, el calostro de

madres delgadas tenía más células totales que las madres con obesidad, con media de 5,9 y 4,0 millones de células por ml de calostro, respectivamente. DE en células enriquecidas del calostro aumentó debido a una muestra con una concentración muy alta de células (39,8 millones de células por mL de calostro). Ambos grupos tienen valores medios similares de células vivas (91 en madres delgadas y 90,2 en madres con obesidad respectivamente). El calostro de madres delgadas contenía en promedio un 20% más leucocitos (células CD45 +) que el calostro de madres con obesidad.

Tabla 2

Características de las muestras sanguíneas y calostro

	Madre delgada (media ± DE [rango])	Madre con obesidad (media ± DE [rango])	Valor de P
Sangre periférica recibida en ml	2.4 ± 0.82 [1.5-4]	2.1±0.95 [0.5-4]	0.49
Calostro recibido en ml	2.2±0.96[0.5-5]	1.4± 0.73[0.4-3]	0.02
Millones de células enriquecidas obtenidas por ml de calostro	5.9±90[0.6-39.8]	4.0±5.50[0.4-21.3]	0.72
Porcentaje de células vivas en el calostro	91.0± 7.10 [75.3- 98.9]	90.2±8.50[68.6- 97.8]	0.74
Porcentaje de CD45+ en el calostro	37.6± 27.40[5.2- 86.4]	30.7±23.6[6.9- 76.9]	0.49

Nota: las muestras de calostro fueron menores en la población de madres con obesidad (0.0.2)

Granulocitos inmaduros

En la sangre, estaban presentes granulocitos inmaduros con una proporción media del 0,53% del total. leucocitos en madres delgadas, frente al 0,63% de las madres con obesidad. La DE aumentó en el grupo de madres con obesidad en comparación con el grupo de madres delgadas (0,53 y 0,74, respectivamente). Una de las madres delgadas tenía un porcentaje excepcionalmente alto de granulocitos inmaduros (3,40%), mientras que todas las demás muestras tenían un porcentaje inferior al 1%, lo que puede haber sesgado la media. En calostro, la frecuencia media de granulocitos inmaduros fue del 0,99% para las madres delgadas y del 0,52% para madres con obesidad. A pesar de observar esta diferencia en el porcentaje medio de granulocitos inmaduros en el calostro de madres con obesidad en comparación con madres delgadas, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (valor de $p=0,35$).

Al comparar grupos, observamos que en el calostro de las madres delgadas hay una media más baja de granulocitos inmaduros en comparación con sangre periférica (0,52 y 0,63%, respectivamente) sin diferencia estadística. En las madres con obesidad, la tendencia es la contraria, ya que el calostro tiene un 0,99% de granulocitos inmaduros mientras que la sangre periférica tiene 0,52%, sin diferencia estadística. Dado que los granulocitos inmaduros en ambas muestras mostraron una distribución no normal (valor de P para la prueba de Ryan Joyner $> 0,1$), los análisis se realizaron utilizando una prueba no paramétrica (Mann-Whitney), que utiliza medianas. Las medianas de calostro fueron 0.36 y 0.37 respectivamente para madres delgadas y madres con obesidad; por lo tanto, no existe una diferencia estadísticamente significativa. El recuento total de granulocitos inmaduros

en el calostro de madres delgadas y con obesidad van de 763 y 42791. Para las madres con obesidad mostraron un rango más amplio, que las delgadas, también con rango de 437 y un máximo de 68351. A pesar de eso, no hubo diferencias estadísticamente significativas (valor de $p = 0,94$). (tabla 3 y 4)

Tabla 3

<i>Descripción estadística para granulocitos inmaduros</i>					
Grupo y muestra	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Madres delgadas, sangre periférica	0.52	0.74	0.37	0.01	3.40
Madres delgadas, calostro	0.62	0.37	0.5	0.24	1.79
Madres con obesidad, sangre periférica	0.53	0.53	0.36	0.07	1.89
Madres con obesidad, calostro	0.99	0.79	0.7	0.17	2.89

Nota: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (analizado con U Mann-Whitney)

Tabla 4

<i>Descripción estadística del total de granulocitos inmaduros por mililitro de calostro</i>						
Grupo	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
Madres delgadas	11652	14163	5312	763	42791	0.94
Madres con obesidad	16288	21624	5811	437	68351	

Nota: no se encontraron diferencias significativas (valor significativo de P menor de 0.05 prueba con Mann-Whitney)

Eosinófilos

Se observó que los eosinófilos tuvieron una media de 0,31% en madres delgadas y 0,65% en madres con obesidad. Las muestras de madres delgadas tuvieron menos variación que las madres con obesidad, donde algunas muestras tuvieron valores altos como casi 4% de eosinófilos, con DE de (0,29 y 0,97%, respectivamente), sin diferencias estadísticas entre grupos. En calostro, madres delgadas tuvieron una media de 1,32% mientras que las madres con obesidad tienen 1,55%, con DE 1,1 y 1,3%, respectivamente. Cuando se compararon, la sangre periférica con calostro en cada grupo, entre las madres delgadas se observaron que la media de eosinófilos es cuatro veces mayor en calostro que en sangre periférica (1,32 y 0,31%, respectivamente), con un aumento de la DE en calostro (1,106 y 0,29%, respectivamente). Esta diferencia es estadísticamente significativa (valor de $P = 0,0001$) (tabla 5). Para las madres con obesidad, la media de eosinófilos en el calostro aumento 2 veces cuando se comparó con sangre periférica (1,55 y 0,65% respectivamente), con DE de 1,38 y 0,97% para cada muestra. Esta diferencia fue estadísticamente significativa con un valor de p de 0,007. En resumen, no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en la media de eosinófilos en sangre periférica y calostro. Sin embargo, existe una tendencia en ambos grupos de aumento de la frecuencia de eosinófilos en el calostro con diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 5

<i>Descripción estadística de eosinófilos</i>					
Grupo y muestra	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Madres delgadas sangre periférica	0.31	0.29	0.17	0.05	0.97
Delgadas calostro	1.32	1.10	1.01	0.37	4.93
Madres con obesidad sangre periférica	0.65	0.97	0.43	0.05	3.78
Madres con obesidad calostro	1.55	1.38	0.99	0.28	5.33

Nota: aumento de la presencia de eosinófilos en calostro al compararlo con la sangre (P = 0,0001) en madres delgadas y (P= 0,007) en madres con obesidad

La descripción estadística para el recuento total de eosinófilos en el calostro de magro y madres con obesidad. El valor medio para las madres delgadas fue 33537, Los rangos que obtuvimos van de 758 a 301370. Para las madres con obesidad, las estadísticas descriptivas son más altas que las madres delgadas, también con un rango más amplio. Este rango pasó de 437 a un máximo de 68351. Incluso cuando la media de madres con obesidad es casi el doble que las delgadas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (valor de $p = 0,75$). Esta ausencia de diferencia estadísticamente significativa puede explicarse en parte por la prueba no paramétrica utilizado, basado en la comparación de medianas y el alta DE presente en ambos grupos.

Tabla 6

Descripción estadística del total de eosinófilos por mililitro de calostro

Grupo	Media	DE	Mediana	Minimo	Maximo	Valor P
Madres delgadas	33537	68564	10453	758	301370	0.75
Madres con obesidad	70424	222631	7129	493	872539	

Nota: no se encontraron diferencias significativas

Basófilos

En sangre periférica, las medias fueron 0,11% y 0,20% para madres delgadas y madres con obesidad respectivamente. En general, los valores fueron inferiores al 0,50%, excepto para dos muestras de madres con obesidad que presentaron 0,67%. Las DE fueron 0,10% y 0,20%, respectivamente. Estadísticamente no hubo diferencia significativa entre los grupos (valor de $p = 0,15$). En calostro, las medias fueron 0,37% y 0,28% para cada grupo. Los valores suelen oscilaron entre 0,01 y 0,60%, excepto para 1 muestra de una madre delgada con valor de 1,21%. Este alto valor se reflejó en una mayor desviación estándar de las madres delgadas (0,25), en comparación con las madres con obesidad (0,14). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (Valor de $p = 0,34$).

En madres delgadas, el calostro evidencio un aumento en 3 veces de basófilos (0,11% en sangre periférica y 0,37% en calostro), con un valor de p de 0,0001. Las madres con obesidad también se mostró esta tendencia, pero en este grupo la diferencia no fue estadísticamente significativo (valor de $p = 0,09$).

Tabla 7

<i>Descripción estadística para basófilos</i>					
Grupo y muestras	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Madres delgadas, sangre periférica	0.11	0.1	0.08	0.01	0.43
Madres delgadas calostro	0.37	0.25	0.32	0.03	1.21
Madres con obesidad, sangre periférica	0.20	0.20	0.15	0.01	0.67
Madres con obesidad, calostro	0.28	0.14	0.28	0.09	0.570

Nota: se encontró una diferencia significativa entre sangre periférica y calostro en madres delgadas ($P < 0.0001$)

En resumen, solo las madres delgadas mostraron una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de basófilos en calostro en comparación con sangre periférica (valor de $P < 0,0001$). El valor medio para las madres delgadas era 2460. Los rangos que obtuvimos estuvieron entre 162 y 38470. Para madres con obesidad, la descripción estadística fue similar a las madres delgadas, pero con un valor máximo más alto. Este rango pasó de 135 a un máximo de 54022. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (valor de $p = 0,36$).

Tabla 8

<i>Descripción estadística del total de basófilos por mililitro de calostro</i>						
Grupo	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
Madres delgadas	7512	11088	2392	162	38470	0.36
Madres con obesidad	7614	14323	1356	135	54022	

Nota: no se encontró diferencia significativa entre los grupos

Neutrófilos

Se observó que la frecuencia media de neutrófilos es similar en madres delgadas y madres con obesidad (74,20% y 73,83%, respectivamente), con DE de 9,92 y 7,08. Una muestra de madre con obesidad mostró un valor anormalmente bajo del 40%, lo que aumentó la DE en este grupo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (valor de $p = 0,98$).

En calostro, ambos grupos mostraron un amplio rango de valores, desde el 17,86% al 89,80%. Los valores medios en madres delgadas fueron de 57.73 y 57.65 para las madres con obesidad una DE de 20.81% y 19.68%, respectivamente. Por lo demás, no hubo diferencia estadísticamente significativa, con un valor de p de 0,80.

En madres delgadas, el calostro presentó menor cantidad de neutrófilos que la sangre periférica, con promedios de 57,73% y 74,20% en sangre. Aun cuando el calostro mostró una DE 2 veces más alta que la sangre periférica (20,81% y 9,92%, respectivamente), se encontró una diferencia estadísticamente significativa (valor de $p = 0,01$). En madres con obesidad, el calostro también fue menor la media en sangre periférica (58,8% y 73,83%,

respectivamente), pero en este caso no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,062$).

En resumen, ambos grupos mostraron una disminución en la frecuencia relativa de neutrófilos en el calostro. Sin embargo, esta tendencia solo fue estadísticamente significativa para las madres delgadas.

Los rangos en calostro de madres delgadas, obtuvimos entre 14,911 y 12,755,978. Por parte de las madres con obesidad, mostraron con un rango similar, de 10,977 a 11,794,182. No hubo diferencia estadísticamente significativa (valor de $p = 0,65$).

Tabla 9

Descripción estadística para neutrófilos

Grupo y muestra	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Madres delgadas Sangre periférica	74.2	9.92	77.7	40.80	83.6
Madres delgadas, calostro	57.73	20.81	59.3	25.7	89.8
Madres con obesidad, sangre periférica	73.83	7.08	76.1	61.5	82.6
Madres con obesidad, calostro	57.67	19.68	59.1	17.6	82.2

Nota: no se encontró diferencias estadísticamente significativas

Tabla 10

Descripción del total de neutrófilos por mililitro de calostro

Grupo	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
Madres delgadas	2,168,321	3,654,293	508,086	14,911	12,755,978	0.65
Madres con obesidad	2,364,345	3,917,193	606,628	10,977	11,794,182	

Nota: no se encontraron diferencias significativas

Células B

En sangre periférica, las madres delgadas tuvieron una media del 2,55% mientras que en las madres con obesidad fue de 2,77%, con DE de 1,05 y 0,87, respectivamente. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre grupos (valor de $p = 0,26$). En calostro, las medias fueron 0,87 y 0,80 para madres delgadas y para madres con obesidad respectivamente. Ambos grupos mostraron la misma DE de 0,76. Estadísticamente no hubo diferencia significativa entre los grupos (valor de $p = 0,71$).

Las células B mostraron una disminución de casi 3 veces en el calostro. Fue estadísticamente significativo (valor de $p < 0,0001$) en madres con obesidad y delgadas.

En resumen, ambos grupos mostraron una disminución en la frecuencia relativa de células B en el calostro. En comparación con sangre periférica los valores de p de 0,0001 y menor de 0,0001 para madres delgadas y madres con obesidad, respectivamente. Sin embargo, la sangre periférica y el calostro comparados entre grupos no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 11

<i>Descripción estadística de las células B</i>					
Grupo y muestras	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Madres delgadas, sangre periférica	2.55	1.05	2.32	1.12	4.6
Madres delgadas, calostro	0.87	0.76	0.63	0.04	2.7
Madres con obesidad, sangre periférica	2.77	0.87	2.55	1.50	4.48
Madres con obesidad, calostro	0.8	0.76	0.45	0.04	2.33

Nota: la comparación en células B entre sangre y calostro fue significativa ($P < 0.0001$) en ambos grupos

El valor medio para las madres delgadas fue de 183 a 76,940 en calostro. Para madres con obesidad, los resultados fueron similares a las madres delgadas, pero con una media y un valor mínimo más bajos, fue de 380 a 70,932. No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa (valor de $p = 0,31$).

Tabla 12

<i>Descripción estadística de células B por mililitro en calostro</i>						
Grupo	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
Madres delgadas	12792	17745	5788	183	76940	0.31
Madres con obesidad	9177	17475	5482	380	70392	

Nota: no se encontraron diferencias significativas en el calostro de ambos grupos

En el análisis posterior, al modificar los parámetros de inclusión para evitar falsos positivos se logró identificar una mayor presencia de linfocitos B en calostro de madres delgadas con un $P = < 0.05$.

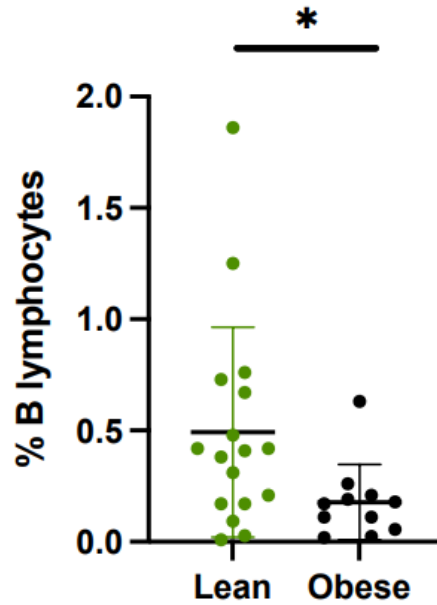


Figura 1 Diferencia de linfocitos B en leche de calostro, superior en madres delgadas ($P < 0.05$)

Células T citotóxicas y NK

En sangre periférica, el valor medio para las madres delgadas fue de 0,62% y 0,91% para las madres con obesidad, con una DE similar de 0,95 y 0,85% para cada grupo. La mayoría de los valores de ambos grupos oscilaron entre 0,01 y 2,20%, excepto una muestra del 3,2% en sangre periférica de una madre con obesidad. No hubo diferencia estadísticamente significativa (valor de $p = 0,26$). En el calostro, las madres delgadas tuvieron una media de 0,51% y madres con obesidad 0,33%, con una DE de 0,42% y 0,34%, respectivamente. Los valores de las madres delgadas mostraron una distribución homogénea, pasando del 0,01% al 1,36%, mientras que casi todas las muestras de las madres con obesidad se agruparon

alrededor del 0,30%, con solo una muestra con más del 1%. Sin embargo, hay no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (valor de $p = 0,34$).

En el grupo de madres delgadas, no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre sangre periférica y calostro (valor de $p = 0,70$). Para las madres con obesidad, la mayoría de las mostraron una tienden a disminuir el porcentaje de células T citotóxicas y NK en el calostro, presentando una diferencia estadísticamente significativa (Valor de $p = 0,007$).

En resumen, la única diferencia significativa para las células T citotóxicas y NK fue la disminución del porcentaje en el calostro para las madres con obesidad ($P=0.007$). Este fenómeno no sucedió en madres delgadas, en la cual no hubo una diferencia estadísticamente significativa en la sangre periférica y el calostro.

Tabla 13

Descripción estadística para las células citotóxicas T y NK

Grupo y muestras	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Madres delgadas, sangre periférica	0.46	0.38	0.39	0.054	1.54
Madres delgadas, calostro	0.51	0.42	0.39	0.04	1.36
Madres con obesidad, sangre periférica	0.91	0.85	0.51	0.18	3.1
Madres con obesidad, calostro	0.33	0.34	0.26	0.04	1.44

Nota: se encontró una diferencia significativa entre sangre y calostro en madres con obesidad ($P=0.007$), esta diferencia no se observó en madres delgadas

El valor medio para las madres delgadas fue de 209 a 39,123. Para las madres con obesidad la descripción estadística fue similar a los obtenidos de las madres delgadas, pero con una

menor mediana. Este rango pasó de 152 a un máximo de 38,383. Sin diferencia estadísticamente significativa (valor de $p = 0,17$).

Tabla 14

<i>Descripción estadística de las células T citotóxicas y NK por mililitro de calostro</i>						
Grupo	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
Madres delgadas	5485	8457	3630	209	39123	0.17
Madres con obesidad	6031	10618	1072	152	38383	

Nota: no se encontró diferencia significativa entre el calostro de los dos grupos

Células T no citotóxicas

En sangre periférica, la media fue de 14,35% en madres delgadas y de 13,81% en las madres con obesidad. Las DE fueron 7,36% y 5,19%, respectivamente, no se encontró una diferencia significativa (valor de $p = 0,97$). El aumento de la DE en sangre periférica de madres delgadas se debió a un valor muy alto de células T no citotóxicas en una muestra, de casi el 40%, mientras que todas las muestras se ubicaron entre el 6 y el 23%. En calostro, el grupo de madres delgadas tuvo una media de 6,46% mientras que es del 7,25% para madres con obesidad. La DE del calostro de madres con obesidad es más alta que en madres delgadas (8.25 y 4.66%, respectivamente, debido a una muestra con 33% de linfocitos T no citotóxicos, siendo el segundo valor más alto 16%). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el calostro de las madres delgadas y madres con obesidad (valor de $p = 0,8$). Para ambos grupos, la tendencia fue una disminución en la media del calostro de las células T no citotóxicas. En las madres delgadas, la media fue de 14,35% en sangre periférica y de 6,46% en calostro, mientras que para las madres con

obesidad fue de 13,81% a 7,25%. Hubo una diferencia estadísticamente significativa para los dos grupos, con P de 0,0003 en madres delgadas y 0,001 para madres con obesidad.

Tabla 15

Descripción estadística de las células T no citotóxicas

Grupo y muestras	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Madres delgadas, sangre periférica	14.35	7.36	11.8	6.32	38.00
Madres delgadas, calostro	6.46	4.66	6.31	0.44	14.70
Madres con obesidad, sangre periférica	13.81	5.19	13.10	7.44	22.90
Madres con obesidad, calostro	7.25	8.25	5.11	0.85	33.60

Nota: Diferencia entre sangre periférica y calostro, con P de 0,0003 en madres delgadas y 0,001 para madres con obesidad en ambos grupos

El valor medio para las madres delgadas es de 2688 y 629638. Para las madres con obesidad, las estadísticas son similares a las de las madres delgadas, pero con una gama más amplia. Este rango pasó de 1154 a un máximo de 726843. A pesar de eso, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa (valor de $p = 0,44$).

Tabla 16

<i>Descripción estadística de las células T no citotóxicas por mililitros de calostro</i>						
Grupo	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
Madres delgadas	114165	184549	50694	2688	629638	0.44
Madres con obesidad	112088	199521	29760	1154	726843	

Nota: no se encontraron diferencias significativas en el calostro

Monocitos no clásicos (CD16+)

En sangre periférica, la media en madres delgadas es 0.419% y para madres con obesidad es 0.47, con DE de 0.30 y 0,47%, respectivamente. En calostro, la media es 1,41% para madres delgadas y 1,38% para madres con obesidad. Las madres delgadas mostraron mayor variabilidad, lo que se reflejó en una DE mayor que las madres con obesidad (1,21 y 0,978%, respectivamente). Tanto la sangre periférica como el calostro no tienen valores estadísticamente significativos, con valores de P de 0,98 y 0,80, respectivamente.

Para las madres delgadas, la media es 3 veces mayor en el calostro que en la sangre periférica (las medias son 1,41 y 0,41 respectivamente) con diferencia estadísticamente significativa (valor de $p = 0,00012$). Madres con obesidad muestran un aumento de casi 3 veces en el calostro en comparación con la sangre periférica (1,38 y 0,47%, respectivamente), también con diferencia estadísticamente significativa (valor de $p = 0,002$).

En resumen, la comparación de muestras entre grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas entre sangre periférica y calostro. Sin embargo, ambos

grupos de estudio presentaron una tendencia de aumento en la frecuencia relativa de los monocitos no clásicos (CD16 +) en el calostro a comparación de la sangre periférica.

Tabla 17

<i>Descripción estadística de los monocitos no clásicos</i>					
Grupo y muestra	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Madres delgadas, sangre periférica	0.41	0.30	0.40	0.05	1.06
Madres delgadas, calostro	1.41	1.21	1.00	0.21	4.92
Madres con obesidad, sangre periférica	0.47	0.47	0.33	0.08	1.91
Madres con obesidad, calostro	1.38	0.97	0.92	0.12	3.12

Nota: se encontró una diferencia entre calostro y sangre periférica de ambos grupos, siendo mayor en sangre
 Madres con obesidad P= 0.00012
 Madres delgadas P= 0.002

El valor medio para las madres delgadas en calostro fue entre 2,688 y 629,638. Para las madres con obesidad, las estadísticas descriptivas fueron similares a las de las madres delgadas, pero con una variación más amplia. Este rango pasó de 1,154 a un máximo de 726,843. No se encontró diferencia estadísticamente significativa (valor de p = 0,44).

Tabla 18

<i>Descripción estadística de monocitos no clásicos (CD16+) por mililitro de calostro</i>						
Grupo	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
Madres delgadas	114165	184549	50694	2688	629638	0.44
Madres con obesidad	112088	199521	29760	1154	726843	

Nota: no hubo diferencia significativa en el calostro de los dos grupos (p=0,44)

Analizamos los parámetros de citometría de flujo para cada subpoblación de leucocitos: FSC-A, SSC-A y fluorescencia de cada marcador celular. A partir de estos parámetros, se generaron gráficos con los valores medios en sangre periférica y calostro, incluida la DE.

- Sin asterisco: valor de $P > 0,05$
- Un asterisco (*): valor de $P < 0,05$
- Dos asteriscos (**): valor de $P < 0,01$
- Tres asteriscos (***) : valor de $P < 0,001$
- Cuatro asteriscos (****): valor de $P < 0,0001$

La Figura 1 muestra los valores medios de FSC-A para cada subpoblación de leucocitos con DE. Barras rojas corresponden a la sangre periférica y las barras azules al calostro. Las diferencias estadísticamente significativas son marcadas con asteriscos. Las células B, los eosinófilos y los neutrófilos no mostraron valores estadísticamente significativos para este parámetro. En calostro, FSC-A disminuyó en monocitos no clásicos (P valor $< 0,0001$) linfocitos T citotóxicos y NK (valor $P < 0,0001$), basófilos (valor $P = 0,038$), linfocitos T no citotóxicos (valor $P = 0,0001$) y granulocitos inmaduros (valor $P < 0,0001$). Basófilos y los neutrófilos solo mostraron diferencia en FSC-A en madres con obesidad, con valores de P de 0.036 y 0.012, respectivamente (datos no mostrados).

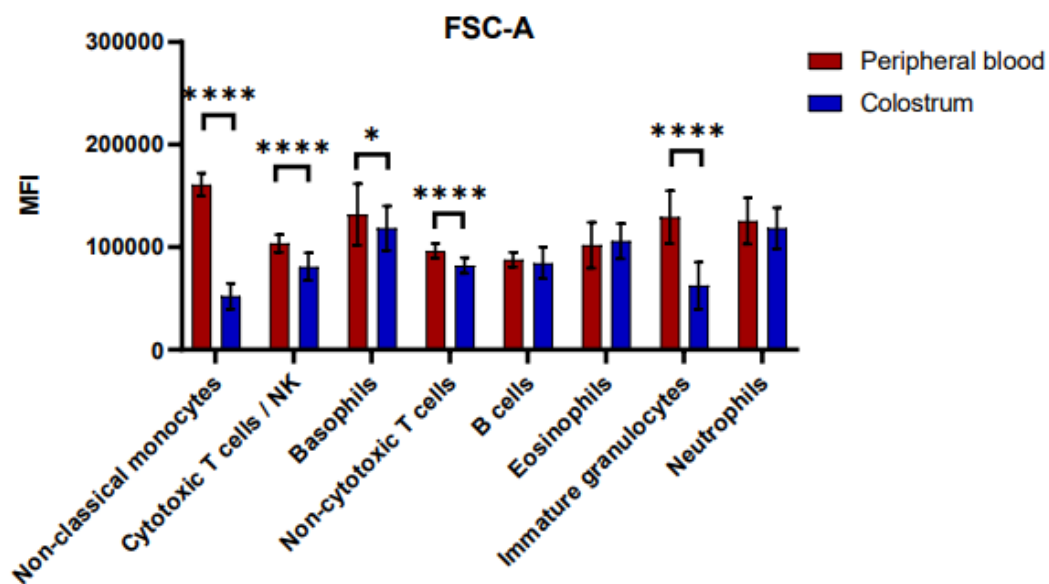


Figura 2 DE para FSC-A en subpoblaciones de leucocitos en sangre (rojo) y calostro (azul)

(*) $P < 0.05$

(****) $P < 0,0001$

La Tabla 19 resume los valores de FSC-A en todas las subpoblaciones de leucocitos. Incluye valor medio y DE. Los monocitos no clásicos y los granulocitos inmaduros mostraron una disminución del doble de FSC-A, mientras que las células T citotóxicas y NK solo un 20%.

Tabla 19

Valores medios con DE para FSC-A en todas las poblaciones de leucocitos

Subpoblación	Sangre periférica (media \pm DE)	Calostro (media \pm DE)
Monocitos no clásicos	161113 \pm 11184	52156 \pm 12590
Células T Citotóxicas y NK	103717 \pm 8317	80991 \pm 13642
Basófilos	131808 \pm 29829	118380 \pm 21696
Células T no citotóxicas	96486 \pm 7022	82094 \pm 7644
Células B	87754 \pm 7231	84744 \pm 15579
Eosinófilos	101886 \pm 22106	105872 \pm 17245
Granulocitos Inmaduros	129255 \pm 79552	62466 \pm 22843
Neutrófilos	125622 \pm 22808	118373 \pm 19722

Nota: cuadro con datos de FSC-A conjunta de los dos grupos

SSC-A

La Figura 3 muestra los valores medios con DE de SSC-A para cada subpoblación de leucocitos en sangre periférica y calostro. Los monocitos y basófilos no clásicos muestran una diferencia en SSC-A entre sangre periférica y calostro, con valores de P de 0,0005 y 0,003, respectivamente. Ninguna otra subpoblación de leucocitos tiene diferencias estadísticamente significativas. Los monocitos no clásicos fueron la única subpoblación con diferencias estadísticamente significativas tanto en FSC-A como en SSC-A.

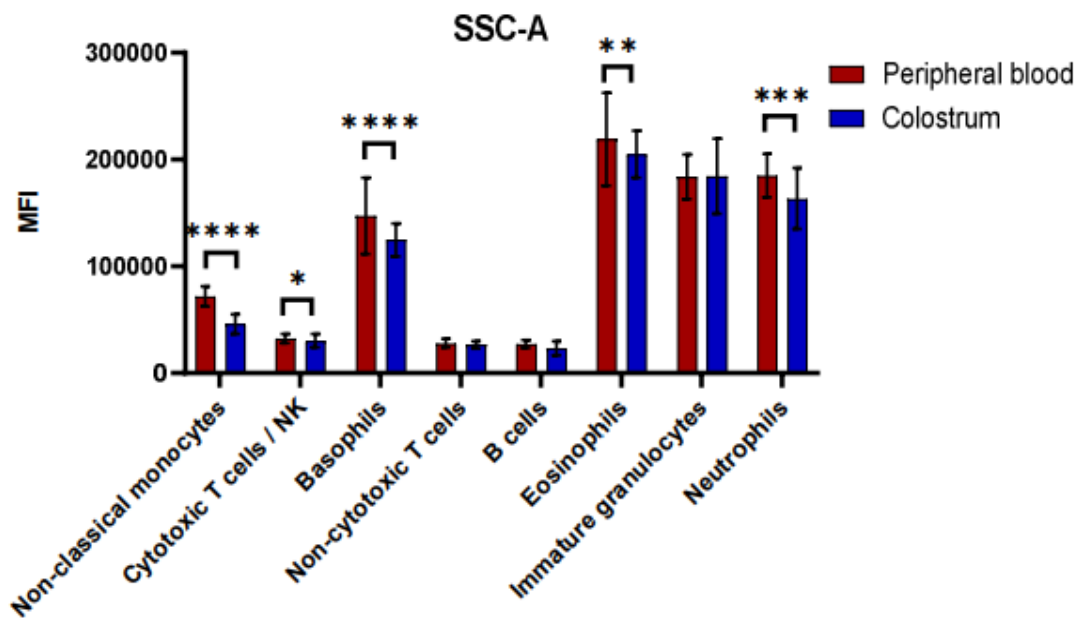


Figura 3 Media y DE para SSC-A en todas las subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica (rojo) y calostro (azul)

P > 0,05

(*) P < 0.05

(**) P < 0.01

(***) P < 0,001

(****) P < 0,0001

La Tabla 20 resume los valores medios para SSC-A con DE en todas las subpoblaciones de leucocitos. Los monocitos no clásicos tienen un 20% en SSC-A, mientras que los basófilos solo un 15%.

Tabla 20

Valores medios con DE para SSC-A en todas las poblaciones de leucocitos

Subpoblación	Sangre periférica (media \pm DE)	Calostro (media \pm DE)
Monocitos no clásicos	71802 \pm 9467	57673 \pm 67862
Células T Citotóxicas y NK	32542 \pm 4385	30423 \pm 6503
Basófilos	147213 \pm 35635	124962 \pm 15378
Células T no citotóxicas	28113 \pm 3894	26518 \pm 3397
Células B	2738 \pm 3815	23304 \pm 6473
Eosinófilos	219201 \pm 43339	204877 \pm 21775
Granulocitos Inmaduros	183834 \pm 20702	184402 \pm 34918
Neutrófilos	185214 \pm 20271	163420 \pm 28629

Nota: Las principales diferencias en SSC-A se encontraron en neutrófilos, basófilos y eosinófilos

CD 2 y CD 294

La Figura 4 muestra los valores medios para CD2 y CD294 (ambos leídos en el mismo filtro) con DE en sangre periférica y calostro. Solo células T citotóxicas y NK, basófilos, células T no citotóxicas y los eosinófilos expresan estos marcadores. La expresión de CD2 y CD294 disminuyó en calostro en células T citotóxicas y NK (valor de P = 0,026). Por el contrario, la expresión de CD2 y CD294 aumenta en calostro en basófilos (valor de P = 0,0003). Células T no citotóxicas y Los eosinófilos no mostraron diferencias entre la sangre periférica y el calostro, con valores de P de 0,29 y 0,156.

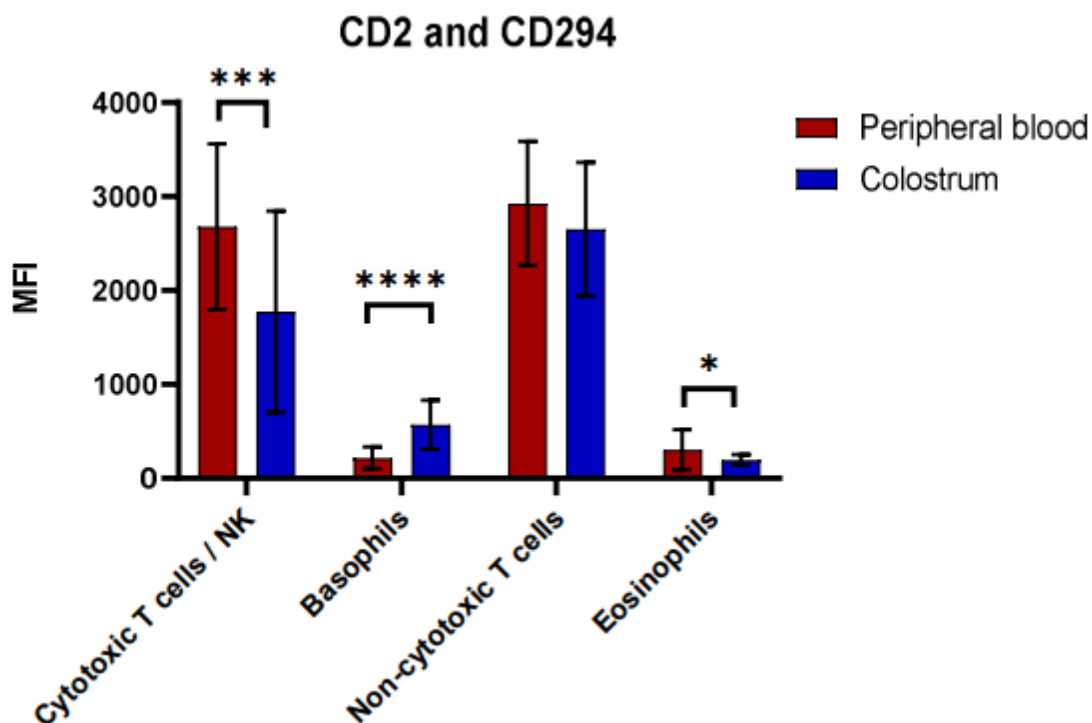


Figura 4 Media con DE para CD2/CD 294 en sangre periférica (rojo) y calostro (azul)

$P > 0,05$

(*) $P < 0,05$

(**) $P < 0,01$

(***) $P < 0,001$

(****) $P < 0,0001$

La Tabla 21 resume los valores medios de CD2 y CD294 con SD en sangre periférica y calostro para linfocitos T citotóxicos y NK, basófilos, linfocitos T no citotóxicos y eosinófilos. La expresión de CD2 y CD294 en linfocitos T citotóxicos y NK disminuyó un 50% en calostro. En, por el contrario, este marcador presentó un aumento de 2 veces en el calostro, en los basófilos. Las otras dos subpoblaciones de leucocitos no mostraron

diferencias estadísticamente significativas entre sangre periférica y calostro. Sin embargo, en madres con obesidad por separado hubo una diferencia estadísticamente significativa, con una disminución en la expresión de CD2 y CD294 en eosinófilos en calostro (valor de $P = 0.026$).

Tabla 21

Valor medio con DE para CD 2 y CD294

Subpoblación	Sangre periférica (media \pm DE)	Calostro (media \pm DE)
Células T citotóxicas y NK	2677 \pm 880	1771 \pm 1070
Basófilos	218.5 \pm 119.5	570.7 \pm 259.4
Células T no citotóxicas	2922 \pm 660	2650 \pm 708
Eosinófilos	304.2 \pm 213.1	197.44 \pm 53.64

Nota: no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

En madres con obesidad presentaron una disminución de expresión de CD2 y CD294 en calostro ($P=0.026$)

CD 16

La Figura 5 muestra los valores medios obtenidos con DE de CD16 en sangre periférica y calostro en monocitos no clásicos (CD16 +), linfocitos T citotóxicos y NK, y neutrófilos. Los Monocitos no clásicos mostraron una diferencia estadísticamente significativa (valor de $p = 0,04$) en sangre periférica entre los grupos, con un aumento de la expresión de CD16 en madres con obesidad. Las células T citotóxicas expresaron más CD16 en calostro de madres delgadas que en sangre periférica (valor de $p = 0,04$). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (valores de P de 0,43 y 0,30, respectivamente) cuando

se compararon. La expresión de CD16 en los neutrófilos descendió drásticamente entre la sangre periférica y el calostro, con un valor de P inferior a 0,0001. Además, la DE de CD16 en neutrófilos de sangre periférica es mayor que en el calostro.

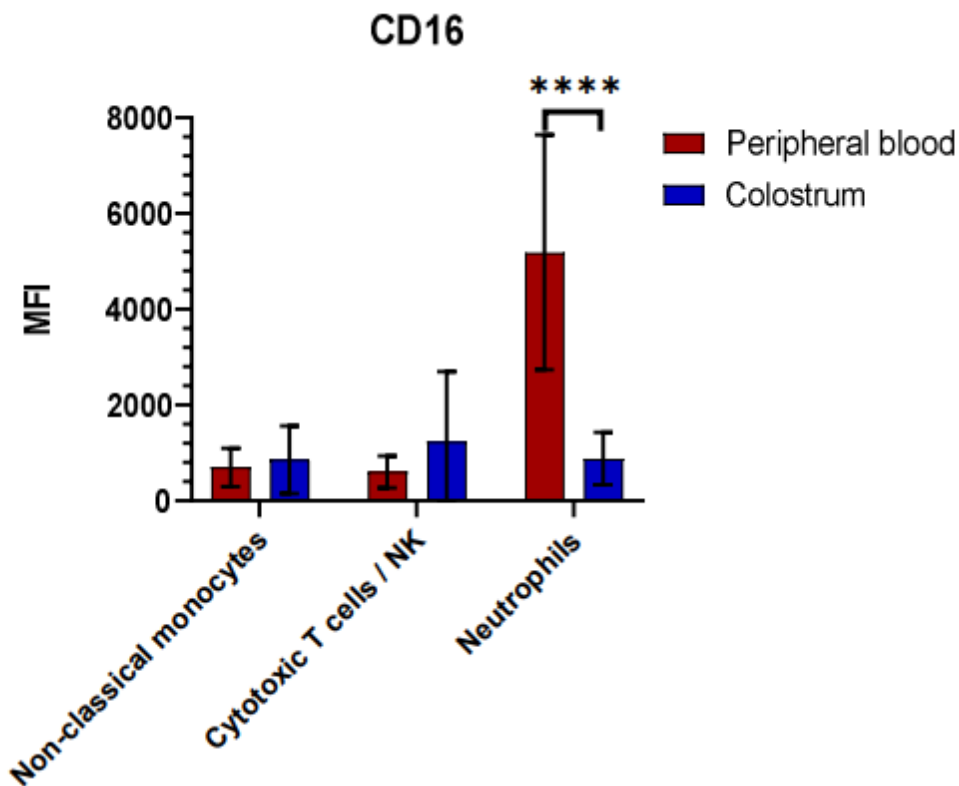


Figura 5 media y DE para CD 16, para sangre periférica (rojo) y calostro (azul)
(****) $P < 0,0001$

La Tabla 22 muestra la descripción estadística de CD16 en sangre periférica y calostro en monocitos no clásicos (CD16 +), linfocitos T citotóxicos y NK, y neutrófilos. Los monocitos no clásicos tuvieron una media y una DE más altas en el calostro que en la sangre periférica (860 ± 707 frente a $705,5 \pm 400,1$, respectivamente). Este aumento es más fuerte en las células T citotóxicas y NK, donde la media en el calostro fue el doble que, en

la sangre periférica, con un aumento de la DE ($1,237 \pm 1464$ para el calostro y $609,7 \pm 333,5$ para sangre periférica). En los neutrófilos, sin embargo, la tendencia presento una disminución en la expresión de CD16 en el calostro, con una media de 885,9 en el calostro, en comparación con 5,190 en sangre periférica. Solo para los neutrófilos la diferencia fue estadísticamente significativa (valor de $p < 0,0001$).

Tabla 22

Valores medios con DE para CD 16 en monocitos no clásicos, células T citotóxicas y NK y neutrófilos

Subpoblación	Sangre periférica (media \pm DE)	Calostro (media \pm DE)
Monocitos no clásicos	705.5 \pm 400,1	860 \pm 707
Células T citotóxicas y NK	609,7 \pm 333.5	1,237 \pm 1,464
Neutrófilos	5,190 \pm 2,451	885,9 \pm 546,1

Nota: la diferencia de neutrófilos presento una $P = < 0,0001$

CD 19

La Figura 6 muestra el valor medio con DE de CD19 en células B de sangre periférica y calostro. No hay una diferencia estadísticamente significativa para este marcador de celda (valor de $P = 0,44$).

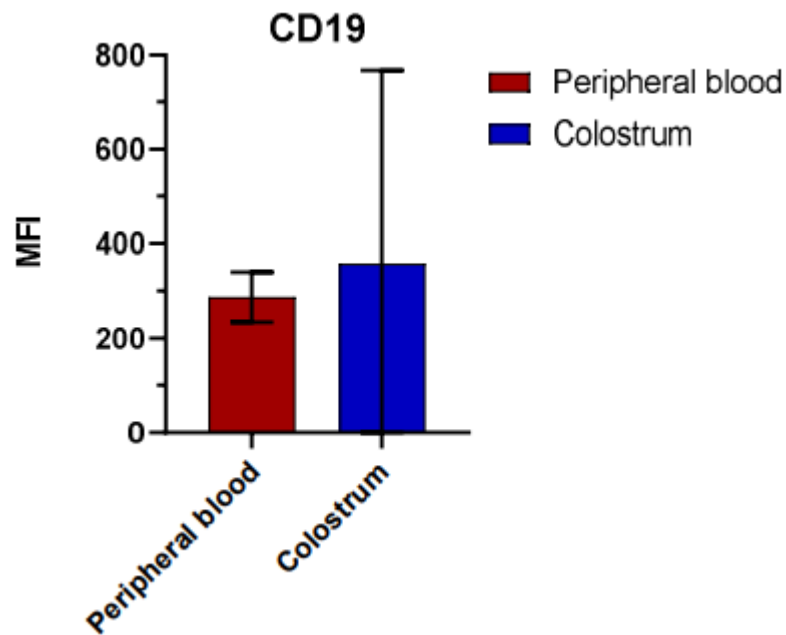


Figura 6 distribución media de CD 19 en linfocitos B en sangre periférica y calostro en conjunto, sin encontrar diferencias significativas

La Tabla 23 resume la media y la DE de CD19 en sangre periférica y calostro para las células B. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Esto podría ser consecuencia de la mayor DE en el calostro debido a una muestra anormal con una intensidad mediana de fluorescencia de 2,494, mientras que el rango para todas las demás muestras está por debajo de 400. Mientras tanto, la sangre periférica tiene una DE de 53,41.

Tabla 23

Medias y DE para CD 19 en células B

Subpoblación	Sangre periférica (media ± DE)	Calostro (media ± DE)
Células B	286.85 ± 53.41	357.4 ± 409.6

Nota: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas

CD 36

La Figura 7 muestra los valores medios con DE para CD36 en monocitos clásicos (CD16-) y no clásico (CD16 +), en sangre periférica y calostro. La media de CD36 aumento en monocitos no clásicos en el calostro, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (valor de $P = 0,07$). La DE en sangre periférica aumentó debido a un valor anormal de 1624, mientras que la mayoría de los datos están por debajo de 600.

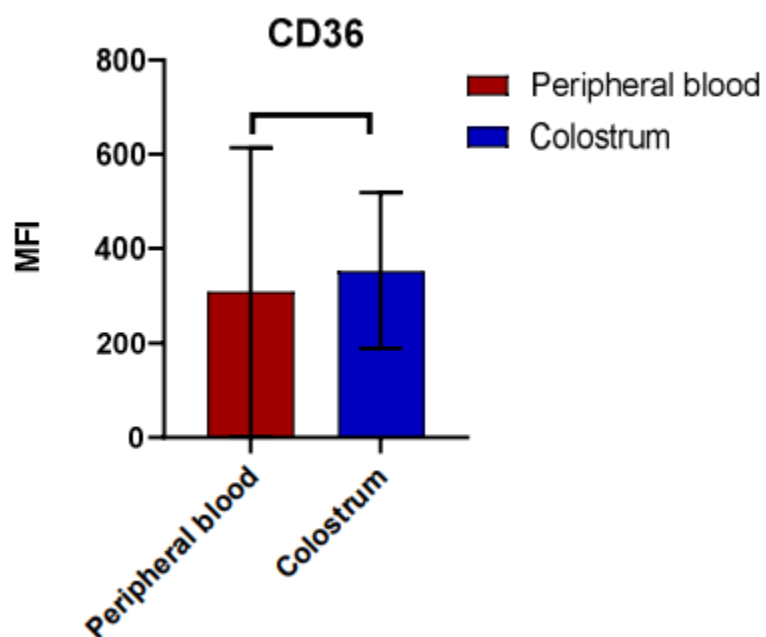


Figura 7 Media con DE para CD36 en monocitos no clásicos para sangre periférica (rojo) y calostro (azul).

En la tabla 24 se muestran las estadísticas descriptivas de CD36 en sangre periférica y calostro en (CD16-) y no clásica (CD16 +) monocitos. Los valores medios de CD36 en sangre periférica y el calostro fueron iguales, pero con aumento de la DE.

Tabla 24

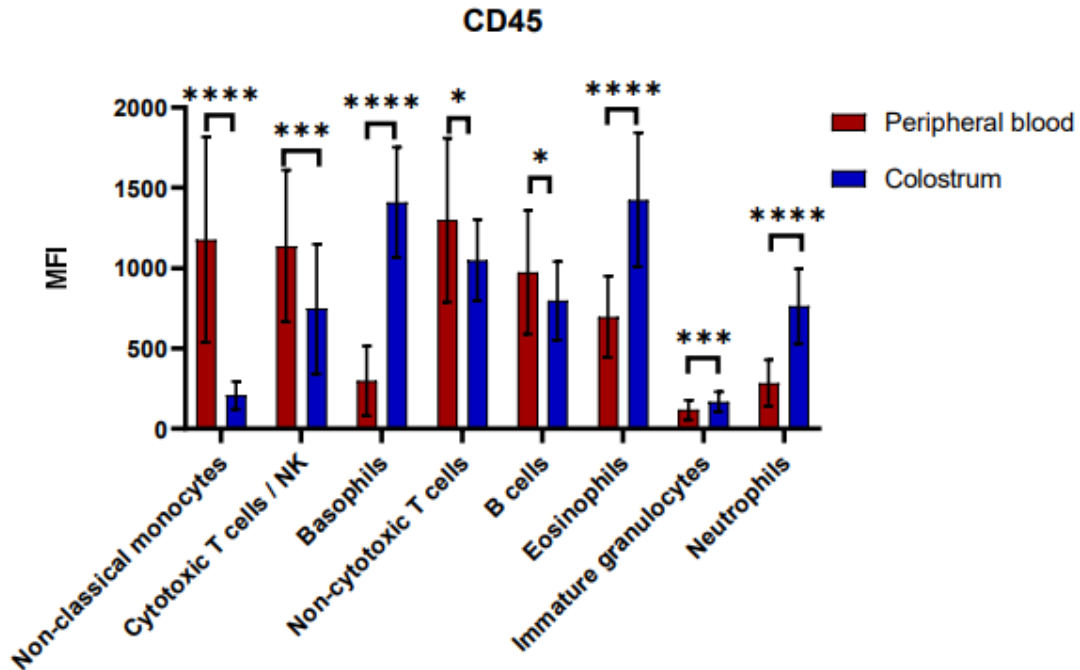
Valores medios con DE para CD36 en monocitos clásicos y no clásicos		
Subpoblación	Sangre periférica (media ± DE)	Calostro (media ± DE)
Monocitos no clásicos	308.1± 306.3	353 ± 164

Nota: no se encontró diferencia estadísticamente significativa

CD 45

La Figura 8 muestra los valores medios con DE para la expresión de CD45 en todas las subpoblaciones de leucocitos, en sangre periférica y calostro. En promedio, las células B y las células T no citotóxicas expresaron menos CD45 en calostro que en sangre periférica, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa, con valores de P de 0,29 y 0,34, respectivamente. Otras subpoblaciones, como monocitos no clásicos y las células T citotóxicas y NK también mostraron una disminución en la expresión de CD45 en el calostro. Estas dos subpoblaciones mostraron diferencias estadísticamente significativas, con valores de P de 0,04 para las células T citotóxicas y NK, y menos de 0,0001 para los monocitos no clásicos, lo que sugiere una fuerte disminución en la expresión.

Curiosamente, todas las subpoblaciones de granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos y granulocitos inmaduros) mostraron una mayor expresión de CD45 en el calostro. El aumento fue bajo, pero estadísticamente significativo en granulocitos inmaduros (valor de p = 0,05). Las otras subpoblaciones muestran aumento más fuerte, con valores de P inferiores a 0,0001 para neutrófilos, eosinófilos; y basófilos.



$P > 0,05$

(*) $P < 0,05$

(**) $P < 0,01$

(***) $P < 0,001$

(****) $P < 0,0001$

La Tabla 25 muestra los valores medios con DE en la expresión de CD45 en cada subpoblación de leucocitos en sangre periférica y calostro. Aunque los valores medios fueron claramente diferentes (1,300 y 1,050 para células T no citotóxicas, de 976 y 797 en células B, para sangre periférica y calostro respectivamente), las DE aumentaron en todos los casos (509 y 253,2 para células T no citotóxicas y de 384,7 y 244,5 en células B, para

sangre periférica y calostro, respectivamente). Este aumento en DE podría afectar la prueba de Mann-Whitney, evitando la posibilidad de un valor de P inferior a 0,05.

Los monocitos no clásicos también mostraron medias claramente diferentes (1,177 en sangre periférica y 209,3 en calostro), con DE alta solo en sangre periférica (640), y no en calostro (86,8). En células T citotóxicas y NK, la DE de sangre periférica y calostro no fueron tan diferentes (473.1 y 404), pero la media en calostro fue 30% menor que en sangre periférica (746 y 1,136 respectivamente).

Los granulocitos inmaduros mostraron la misma DE en sangre periférica que en calostro (61,3 y 61,5 respectivamente), con una media más alta en calostro (167,7) que en sangre periférica (116,9). La fluorescencia de CD45 en eosinófilos fue 2 veces mayor en calostro (1,426,4) que en sangre periférica (695,9), con DE de 417,6 y 253,8, respectivamente.

Los neutrófilos también tuvieron un aumento del doble de la expresión de CD45 en el calostro (762,7 frente a 284,3 en sangre periférica), con un aumento de la DE (232,1 versus 143,4 en sangre periférica). Finalmente, los basófilos mostraron un aumento de 4 veces de CD45 en calostro (1410,5 frente a 298,1 en sangre periférica). La DE en el calostro es 342,8 y 217 en sangre periférica. En todos los casos, las diferencias fueron estadísticamente significativas.

En algunos casos, la diferencia estadísticamente significativa ocurre solo en madres con obesidad. Este es el caso de las células T citotóxicas y NK, las células T no citotóxicas y las células B. Los valores de P comparando sangre periférica versus calostro fueron de 0,00027, 0,001 y 0,001, para cada subpoblación de madres con obesidad, mientras que en

madres delgadas estos valores son 0.08, 0.68 y 0.59. Sucede lo contrario en granulocitos inmaduros, donde el valor de P en madres delgadas es 0,005 y 0,111 para madres con obesidad.

Tabla 25

Valores medios con DE para CD45 en todas las subpoblaciones de leucocitos para sangre periférica y calostro en cada grupo

Subpoblación	Sangre periférica (media \pm DE)	Calostro (media \pm DE)
Monocitos no clásicos	1177 \pm 640	209.3 \pm 86.8
Células T citotóxico y NK	1136.6 \pm 473.1	746.9 \pm 404
Basófilos	298.1 \pm 217.8	1410.5 \pm 342.8
Células T no citotóxicas	1300 \pm 509	1050.9 \pm 253.2
Células B	976 \pm 384.7	797 \pm 244.5
Eosinófilos	695.9 \pm 384.7	797 \pm 244.5
Granulocitos inmaduros	116.9 \pm 61.3	167.7 \pm 61.5
Neutrófilos	284.3 \pm 143.4	762.7 \pm 232.1

Nota: se observa un aumento en calostro sobre sangre periférica en neutrófilos, eosinófilos y basófilos ($P < 0.001$)

En caso de células T citotóxicas y NK ($P = 0,00027$), células T no citotóxicas ($P = 0,001$) y células B ($P = 0,001$), el aumento en calostro solo se observó en madres con obesidad.

Capítulo 5.- Análisis y discusión de resultados

Según nuestro conocimiento este es el primer estudio en que se divide el grupo materno tomando en cuenta las patologías maternas asociadas al embarazo como por ejemplo la preeclampsia, hipertensión y diabetes como factor modificador. Estudios previos no hacían diferencia en los grupos de peso materno, poniendo a madres con obesidad y con sobrepeso, en la misma población, lo que causaba una menor diferencia entre los grupos.

Es importante mencionar, que los estudios previamente realizados de la población linfocitaria en leche materna se realizaban en países con madres predominantemente caucásicas, por lo que el realizar estudios que puedan incluir mayor variabilidad genética como Latinoamérica, permitirá incluir mayor variedad en la población estudiada.

Como hallazgo se encontró un menor volumen en las muestras de calostro en las madres con obesidad a comparación de las madres delgadas ($P=0,02$), siendo las muestras de madres delgadas 2,2 mililitros y las madres con obesidad 1,4 mililitros, las cuales se encontraron por debajo de lo reportado en la literatura. (20) En las madres con sobrepeso y obesidad, se ha observado resistencia a la prolactina (39) lo que sugiere una lactogénesis retrasada en las madres con obesidad.

Al realizar el estudio de la leche materna, se encontraron pocas diferencias en los dos grupos en estudio, esto pudiera significar que existe un bajo impacto de la obesidad en la proporción celular de la leche materna o que se requiere de un número mayor de muestras para alcanzar alguna diferencia estadísticamente significativa.

El número de células leucocitarias que encontramos muestra una variabilidad que va desde 0,6 – 39,8 millones en madres delgadas y 0,4-21,3 millones en madres con obesidad, en Hassiotou F 2013(40) reportan 0,01 a 13 millones de células, lo que indica una mayor población en nuestras muestras que la reportada. Ya que en nuestro estudio se realizó una técnica metodológica modificada, utilizando 400 rcf durante la centrifugación de las muestras para evitar la lisis celular, mientras que otros autores como Trend y Col (2015) (44) utilizaron 600 rcf. Esta diferencia en la preservación celular podría explicar la diferencia en el resultado de la cantidad de células. Es importante considerar que el uso de métodos que pudieran causar mayor lisis celular puede provocar la unión de anticuerpos con células lisadas y aun así causar un evento en la citometría de flujo lo que modificaría el resultado. También se tiene que tomar en consideración que este aumento se presenta en los dos grupos, no es posible explicarlo únicamente por el estado inflamatorio de las madres con obesidad. es necesario aumentar el número de variables que se pudieran asociar a inflamación aguda y crónica para identificar la causa de este aumento en la celularidad de la leche, considerando factores geográficos de nuestra región y considerar replicar este estudio en otras regiones geográficas para realizar una comparación.

En nuestro estudio encontramos que, en sangre periférica, los valores de neutrófilos fueron de $74,2 \pm 9,92$ y $73,83 \pm 7,08$ en madres delgadas y madres con obesidad respectivamente, sin encontrar una diferencia estadísticamente significativa entre estos 2 grupos ($P=0,98$). Estudios realizados en estas poblaciones describieron valores similares (41). Al comparar el calostro y la sangre periférica, se encontró que las madres delgadas tenían una menor cantidad de neutrófilos en calostro ($P=0,01$) mientras que las madres con obesidad esta

reducción fue menor ($P=0,062$), sin embargo, esta diferencia no se vio reflejada en la cantidad absoluta de neutrófilos en calostro ($P=0,65$). El valor clínico de los neutrófilos aún no está completamente dilucidado, sin embargo, en estudios ex vivo, se ha observado que cuentan con capacidad de opsonización y se ha asociado un conteo bajo de neutrófilos en leche materna con el posterior desarrollo de ECN. (45)

Los niveles medios en sangre de eosinófilos fueron de 0,31% en madres delgadas a comparación de 0,65% en madres con obesidad, sin encontrar una diferencia significativa entre los grupos, dichos valores se encuentran dentro de rangos normales según la literatura (42). Los valores encontrados en calostro fueron de hasta 19 veces los descritos en estudios previos (Trend y Col 2015) (43), observando valores superiores en madres con obesidad. Sin embargo, cuando se analizaron las diferencias entre los niveles de eosinófilos en calostro de los dos grupos, no hubo una diferencia significativa. Cuando se calculó la diferencia entre sangre periférica y calostro, se encontró un aumento importante en la presencia de eosinófilos en calostro, presentando una $P= 0,0001$ en madres delgadas y para madres con obesidad $P=0,007$. Este hallazgo es de interés, ya que se ha descrito que la presencia de más de 1% de eosinófilos en leche materna se asocia al posterior desarrollo de alergia a la proteína de leche de vaca o dermatitis atópica (44), siendo que en nuestros dos grupos se observaron niveles superiores ($1,32 \pm 1.1$ para madres delgadas y $1,55 \pm 1.3$ para madres con obesidad). Se deben de considerar factores ambientales que pudiera explicar este aumento importante en los eosinófilos en calostro materno, así como seguimiento en la evolución clínica de los infantes y vigilar la prevalencia de enfermedades alérgicas que se pudieran presentar.

En cuando a los basófilos, las medias encontradas en sangre periférica fueron de 0,11% y 0,2% para madres delgadas y madres con obesidad respectivamente sin encontrar diferencias significativas ($P=0,15$). Este valor de basófilos se encontró ligeramente sobre los valores normales descritos en la literatura (0-0,1%) (42). En calostro no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($P=0,34$), sin embargo, se encontraron niveles muy superiores en nuestras 2 poblaciones con respecto a literatura previa (Trend y Col 2015) (43) quienes obtuvieron un rango de 1,490 a 3,410, mientras que en nuestras poblaciones fueron de 162 a 38,470 para madres delgadas y 135 a 54,022 madres con obesidad. Este aumento de basófilos junto con el de los eosinófilos se ha asociado a enfermedades alérgicas desarrolladas en los lactantes (45). Ya que este hallazgo se realizó en ambos grupos de estudio, el factor que modifica los niveles de basófilos puede ser genético o ambiental.

En cuanto a los granulocitos inmaduros no encontramos niveles elevados en sangre (0,53% y 0,63% para madres delgadas y con obesidad respectivamente), lo que era esperado, ya que se excluyeron a las madres que pudieran haber presentado una infección activa. Es de notarse que una madre delgada presento niveles excepcionalmente altos (3,4%) en comparación con el resto de las madres sin embargo esto no causo una diferencia estadísticamente significativa, tampoco encontramos diferencia significativa en los niveles en calostro comparar ambos grupos ($P=0,94$). Nuestros resultados concuerdan con estudios previos (43), aun no se ha dilucidado la función de estas células sobre la protección en el recién nacido. (45)

En sangre periférica para linfocitos B las madres delgadas presentaron 2,55% mientras que en madres con obesidad 2,77%, encontrándose dentro de rangos normales según la literatura (46). No hubo diferencia significativa en las muestras de sangre periférica y en calostro, las medias se encontraron en 0,87 y 0,80 para madres delgadas y con obesidad respectivamente. Las células B mostraron una disminución de casi 3 veces en el calostro. Es estadísticamente significativo (valor de $p < 0,0001$) en ambos grupos.

Aun así, el valor medio obtenido fue 13 veces mayor que el informado por Trend y Col. (2015) (43), la acción inmunológica de los linfocitos B en la leche materna aun requiere estudio, sin embargo, existen reportes de la expresión de activación en los linfocitos B de la leche materna lo que hace teorizar una probable función en inmunidad de memoria para compensar la falta de inmunidad adquirida del recién nacido, sin embargo, evidencia directa aún no se ha presentado. (45) cabe mencionar que durante el análisis posterior a este estudio de los linfocitos B, modificando los parámetros de ventana de la citometría de flujo, para evitar eventos falsos positivos, se encontró una diferencia significativa entre el calostro de los dos grupos ($P < 0,05$). Dicha diferencia se discutirá en publicaciones posteriores.

Para las células T citotóxicas y NK en sangre periférica se encontraron 0,62% y 0,91% para madres delgadas y madres con obesidad, encontrando DE similares para cada grupo ($P = 0,26$). Estos valores están dentro de rangos normales según estudios previos. (47) los valores medios obtenidos en calostro fueron de 0,51% y 0,33% para madres delgadas y con obesidad respectivamente, sin encontrar una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,34$), tampoco se encontró diferencia significativa entre el calostro de los dos grupos maternos ($P = 0,7$). Al comparar la población en sangre periférica y calostro, se observó una

reducción estadísticamente significativa en madres con obesidad que no se pudo observar en madres delgadas ($P=0.007$). a pesar de esta diferencia, los valores obtenidos fueron 5 veces mayores de los reportados por Trend y Col. (2015) (43) en ambos grupos. Al igual que en linfocitos tipo B, este grupo celular ayuda a promover la maduración y el desarrollo del sistema inmune nativo del recién nacido (48).

Para las células T no citotóxicas el valor medio de sangre periférica fue de 14.35% y 13.81% para madres delgadas y con obesidad respectivamente, sin encontrar una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.97$), al igual no se encontraron diferencias significativas entre esta población celular en calostro ($P=0.8$). al comparar las diferencias entre calostro y sangre, se encontró una reducción en calostro estadísticamente significativa en ambos grupos ($P=<0.001$). los valores en calostro fueron 21 veces superiores en calostro comparados con Trend y Col. (2015) (43).

Los monocitos no clásicos CD 16+ no presentaron diferencias significativas en sangre periférica o en calostro al valorar a los grupos, al comparar la cantidad de monocitos no clásicos CD 16+ en sangre periférica y calostro de los mismos grupos encontramos un aumento en calostro, el cual era estadísticamente significativo en ambos grupos ($P=<0,002$). Estos niveles fueron 37 veces superiores al reportado por Trend y Col. (2015) (43). Es bien sabido que este tipo de monocito participa en la presentación de antígenos, así como regulador del proceso inflamatorio, (49) por lo que se pudiera teorizar realiza esta misma acción a nivel intestinal del recién nacido.

Al analizar el tamaño de las células se encontró diferencias significativas medido por FSC-A para monocitos no clásicos ($P=<0,0001$), células T citotóxicas y NK ($P=<0,0001$),

basófilos ($P=0,038$), células T citotóxicas ($P=0,0001$) y granulocitos inmaduros ($P=<0,0001$). Todas estas mostraron un menor tamaño en calostro comparado con sangre periférica. El tamaño de las células se relaciona con la condensación de la cromatina perinuclear, densificación citoplasmática, pérdida de contenido de la membrana nuclear o ruptura del núcleo en fragmentos discretos, reportes previos han correlacionado un menor tamaño celular con necrosis y apoptosis, (50) sin embargo esto aún no se ha demostrado.

En el estudio de la complejidad celular mostrada por el SSC-A, las diferencias principales que se encontraron fueron en monocitos no clásico ($P=0,0005$), basófilos ($P=0,003$), neutrófilos ($P=<0,0005$) y células T citotóxicas y NK ($P=<0,05$). Este valor, aunado al FSC-A se han asociado a apoptosis, (50) sin embargo esta reducción en la complejidad también podría ser explicada por desgranulación celular secundaria a actividad celular dentro de la glándula.

El resultado en CD 2 y CD294 demostraron una disminución en la expresión en calostro en las células T no citotóxicas y eosinófilos, con un aumento en los basófilos, CD294 es el receptor de prostaglandina 2. Los mastocitos son la principal fuente de prostaglandina, induciendo vasodilatación, aumentando la permeabilidad y promoviendo la migración de leucocitos hacia los tejidos. Los eosinófilos, basófilos y células Th2 expresan CD294. (52) La activación de células Th2 regula negativamente la expresión de CD294. (53) Nuestros resultados muestran una disminución en expresión de CD294 en células T no citotóxicas, lo que indicaría que estas células están activadas. Esta observación corresponde con el informe anterior de linfocitos activados en el calostro humano. (54) Estos linfocitos activados en el calostro expresan niveles más altos de HDL DR, y se encuentran en frecuencias más altas

que en sangre periférica, según estudios previos. El CD294 está implicado en la migración a tejidos de eosinófilos (55) y basófilos (56). Nuestros resultados para basófilos y eosinófilos son opuestos. Los basófilos muestran una mayor expresión de CD294 en el calostro, lo que podría ser un indicativo de su migración a las glándulas mamarias. Sin embargo, los eosinófilos en madres delgadas no muestran diferencia significativa entre la sangre periférica y el calostro, mientras que los eosinófilos de las madres con obesidad tienen más CD294 en sangre periférica que en calostro. No hay información disponible para explicar la regulación a la baja de CD294 en eosinófilos.

En cuanto a CD16, los monocitos no clásicos mostraron una diferencia significativa ($P=0.04$) en sangre entre los grupos con un incremento en la expresión en madres con obesidad. Las células T citotóxicas expresaron más CD 16 en calostro que en sangre periférica en madres delgadas. En los dos grupos la expresión en calostro fue significativamente menor, comparada con sangre periférica en neutrófilos. CD16 es un receptor $FC\gamma$ expresado por diferentes células. En las células T gamma-delta, las células T citotóxicas, y NK, es clave para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, (57) mientras que para los neutrófilos promueve la fagocitosis de antígenos opsonizados (58). Esto concuerda con la literatura en la cual se encuentra menor actividad de los neutrófilos en leche materna. (45)

El resultado de los CD45 mostró que, en promedio, las células B y las células T no citotóxicas expresan una menor cantidad de CD45 en calostro que en sangre periférica. Otras poblaciones como los monocitos no clásicos y las células T citotóxicas y NK también demostraron esta disminución presentando una diferencia estadísticamente significativa

($P=0.04$ y $P=<0.0001$ respectivamente). en la subpoblación de granulocitos observamos un efecto inverso, con aumento en la expresión en calostro.

Al analizar los grupos de manera individual se encontraron algunas diferencias interesantes. La diferencia de calostro y sangre periférica en células T citotóxicas y NK, células T no citotóxicas y células B, aumenta en las madres con obesidad, sin encontrar esta diferencia en las madres delgadas. Observando un efecto inverso sobre granulocitos en donde las madres delgadas presentan aumento en la expresión de CD45, no observado en madres con obesidad.

El CD45 es conocido como antígeno común leucocitario, es una glicoproteína de 240 kD. Se expresa de manera constitutiva en la superficie celular de todas las células hematopoyéticas, incrementa su densidad de expresión en los estadios finales de la hematopoyesis, en los diferentes linajes celulares leucocitarios y permanece de manera estable, en las células maduras (59). CD45 es clave para la activación y función de las células T y B. Fosforila diferentes quinasas de la familia Src. sustratos en cada linaje, pero las funciones específicas no están claras (60). Nuestros hallazgos muestran que la expresión de CD45 disminuye en las células T del calostro, también indican una regulación a la baja de CD45 en células B de calostro y monocitos. En los neutrófilos, el CD45 regula la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos a través de $FC\gamma R$, con producción de IL-6 y efectos inflamatorios (61). En infecciones bacterianas graves y agudas, Los neutrófilos de sangre periférica regulan positivamente la expresión de superficie de CD45 (62). Nuestros resultados muestran un aumento estadísticamente significativo en la expresión de CD45 en el calostro neutrófilos. Como las bacterias del calostro pueden estar adheridas a la superficie de las células en lugar de ser internalizados (63), los neutrófilos del calostro podrían exponerse a estas bacterias o

sus antígenos. Esta exposición podría ser responsable del fenotipo de activación aquí observado. El aumento de la expresión de CD45 en eosinófilos es característico de su activación En pacientes asmáticos que muestran una mayor expresión de CD45 y CD45RO (64). Nuestros resultados muestran una mayor expresión de CD45 en eosinófilos del calostro, que podría ser una señal de activación potencial. Los basófilos también mostraron una mayor expresión de CD45 en calostro. Sin embargo, la función exacta de CD45 para estas células aún no está clara, por lo que no posible establecer una implicación clínica de este hallazgo.

Capítulo 6.- Conclusión

Aún existe un amplio campo en el estudio de la leche materna y sus implicaciones inmunológicas, en nuestro estudio, aun cuando no se encontraron diferencias significativas en el número de células entre la leche materna de los dos grupos. El número total de células fue mayor a lo descrito en estudios previos. Este resultado podría ser explicado por la metodología en el proceso de las muestras, el cual fue más gentil y pudiera haber preservado el número de células viables al momento del conteo por el citómetro de flujo o por algún factor ambiental, el cual aumente el número de células en calostro. Ambas posibilidades se pueden estudiar aumentando el número de muestras en estudios similares que incluyan más factores ambientales que pudieran estar asociadas a este aumento.

Se propone se realicen estudios seriados y de seguimiento. Se sabe que el número de linfocitos en leche materna se modifica con el paso del tiempo, la relación de estas y la presencia de diferentes subpoblaciones con respecto a la presencia o no de obesidad en la madre no se ha estudiado. Además de dar un seguimiento clínico de los infantes, ya que en nuestro estudio el número de basófilos, eosinófilos y neutrófilos fue diferente del de estudios previos. Estas células se han asociado a la presencia de asma y dermatitis atópica, así como protección para ECN. Por lo que sería de interés valorar la eficacia clínica en el infante.

También se encontró una diferencia importante tanto en el tamaño y la complejidad de las células, que generalmente se asocia a un estado apoptótico sin embargo para estudios posteriores se debe incluir en el estudio de citometría de flujo, tinciones y parámetros que

descarten o confirmen un estado apoptótico. Además de considerar dentro de los protocolos indicaciones específicas para el manejo de las muestras y evitar que existan factores externos que expliquen la pérdida de viabilidad de las células.

Por último, los marcadores celulares de más interés fueron los CD45 y CD16. Ya que estos marcadores son indicadores de madures y función celular, las diferencias en la expresión de CD45 y CD16 en la leche de madre delgada versus leche de madre con obesidad, podría representar una menor actividad sobre sus funciones específicas. Se propone se debería de agregar el estudio de actividad contra patógenos en células con potencial de opsonización CD45 y CD16 tanto de madres delgadas como con obesidad, para poder comparar su actividad.

Sesgos potenciales y estrategias para evitarlos

El sesgo principal de este estudio es que las observaciones hechas en el mismo no permiten generalizarlas al total de la población, sino solamente a la población que es la usuaria habitual del Hospital Regional Materno-Infantil, excluye por ejemplo a los estratos socioeconómicos más altos. Tampoco se pueden aplicar los hallazgos a poblaciones que recientemente han migrado a la región, ni a poblaciones en tránsito.

Apéndice

Nota

La presente investigación deriva directamente del estudio titulado: Caracterización de la microbiota en la leche humana temprana, siendo este parte de dicho estudio. Se Utilizaron las mismas muestras para el estudio, por lo que no es requerido realizar nuevas enmiendas de aprobación.

Referencias

- (1) Torloni MR, Betrán AP, Horta BL, Nakamura MU, Atallah AN, Moron AF, Valente O, Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis, *Obes Rev.* 2009 Mar;10(2):194-203. Epub 2008 Nov 24.
- (2) Gunatilake RP, Perlow JH, Obesity and pregnancy: clinical management of the obese gravida. *Am J Obste Gynecolo.*2011 Feb;204(2):106-19
- (3) lack RE, Victora CG, Walker SP, et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet (London, England).* 2013;382(9890):427–451. doi:10.1016/S0140-6736(13)60937-X
- (4) Cosío TG De, C M, Escobar-zaragoza L, et al. Prácticas de alimentación infantil y deterioro de la lactancia materna en México. 2013;55(1):170–179.
- (5) Black RE, Victora CG, Walker SP, et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet (London, England).* 2013;382(9890):427–451. doi:10.1016/S0140-6736(13)60937-X
- (6) Claud EC, Walker WA. Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2001;15(8):1398–1403. doi: 10.1096/fj.00-0833hyp
- (7) Hamosh M. Bioactive factors in human milk. *Pediatr Clin North Am.* 2001;48(1):69–86.
- (8) Jiménez Blanco. G. (2019). *Caracterización del microbiota, en leche humana temprana, de madres con diabetes mellitus gestacional* [Tesis para obtener el grado de: Especialista en Neonatología]. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

- (9) Quigley M, Embleton ND, Mcguire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;2018(6). doi: 10.1002/14651858.CD002971.pub4
- (10) Sankar MJ, Sinha B, Chowdhury R, et al. Optimal breastfeeding practices and infant and child mortality: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* 2015;104(467):3–13. doi:10.1111/apa.13147
- (11) Lawrence RM, Lawrence RA. The Breast and the Physiology of Lactation. En: Creasy and Resnik's *Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice*. Eighth Edi. Elsevier Inc.; 2019:161-180.e3. doi:10.1016/B978-0-323-47910-3.00011-5
- (12) Ramsay DT, Kent JC, Hartmann RA, Hartmann PE. Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging. *J Anat.* 2005;206(6):525–534. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00417.x
- (13) Neville MC. Anatomy and Physiology of Lactation. *Pediatr Clin North Am.* 2001;48(1):13–34. doi:10.1016/S0031-3955(05)70283-2
- (14) Sriraman NK. The Nuts and Bolts of Breastfeeding: Anatomy and Physiology of Lactation. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2017;47(12):305-310. doi: 10.1016/j.cppeds.2017.10.001
- (15) Neubauer SH, Ferris AM, Chase CG, et al. Delayed lactogenesis in women with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 1993;58(1):54–60. doi:10.1093/ajcn/58.1.54
- (16) Chapman DJ. Risk Factors for Delayed Lactogenesis among Women with Gestational Diabetes Mellitus. *J Hum Lact.* 2014;30(2):134–135. doi:10.1177/0890334414525566
- (17) Brownell E, Howard CR, Lawrence RA, Dozier AM. Delayed Onset Lactogenesis II Predicts the Cessation of Any or Exclusive Breastfeeding. *J Pediatr.* 2012;161(4):608–614. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.03.035

- (18) Toscano M, Grandi R De, Grossi E, Drago L. Role of the human breast milk-associated microbiota on the newborns' immune system: A mini review. *Front Microbiol.* 2017;8(OCT):1-5. doi:10.3389/fmicb.2017.02100
- (19) Manuscript A, Factors B. NIH Public Access. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. 2014;60(1):1-24. doi: 10.1016/j.pcl.2012.10.002.Human
- (20) Polin, R (2017). Human Milk Composition and Function in the Infant. En R. Polin (Ed), *Fetal and Neonatal Physiology* (5 ed, 1 vol, pp. 273-280) Elsevier
- (21) Ninkina N, Kukharsky MS, Hewitt M V., et al. Stem cells in human breast milk. *Hum, Cell.* 2019;32(3):223–230. doi:10.1007/s13577-019-00251-7
- (22) Witkowska-Zimny M, Kaminska-El-Hassan E. Cells of human breast milk. *Cell Mol Biol Lett.* 2017;22(1):1–11. doi:10.1186/s11658-017-0042-4
- (23) Geddes D, Hassiotou F, Wise M HP. Human Milk Composition and Function in the Infant. En: *Fetal and Neonatal Physiology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017:273–280.
- (24) Malgorzata Witkowska-Zimny (2017), Cells of human breast milk, *Cell Mol Biol Lett*, vol 22: 11 doi: 10.1186/s11658-017-0042-4
- (25) Fan, Y., Chong, Y. S., Choolani, M. A., Cregan, M. D., & Chan, J. K. Y. (2010). Unravelling the Mystery of Stem/Progenitor Cells in Human Breast Milk. *PLOS ONE*, 5(12), e14421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014421>
- (26) Molès, J.-P., Tuailon, E., Kankasa, C., Bedin, A.-S., Nagot, N., Marchant, A., McDermid, J. M., & Van de Perre, P. (2018). Breastmilk cell trafficking induces microchimerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 29(2), 133–143. <https://doi.org/10.1111/pai.12841>
- (27) Mikami, T., Mizumoto, H., Katayama, T., & Hata, D. (2019). Transition of gastric pH after birth for verification of feeding tube placement. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 61(8), 832–834. <https://doi.org/10.1111/ped.13918>

(28) Ma, L. J., Walter, B., Deguzman, A., Muller, H. K., & Walker, A. M. (2008). Trans-epithelial immune cell transfer during suckling modulates delayed-type hypersensitivity in recipients as a function of gender. *PloS One*, 3(10), e3562.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.000356>

(29) Aydın, M. Ş., Yiğit, E. N., Vatandaşlar, E., Erdoğan, E., & Öztürk, G. (2018). Transfer and Integration of Breast Milk Stem Cells to the Brain of Suckling Pups. *Scientific Reports*, 8(1), 14289. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32715-5>

(30) Calder, P. C., Krauss-Etschmann, S., Jong, E. C. de, Dupont, C., Frick, J.-S., Frokiaer, H., Heinrich, J., Garn, H., Koletzko, S., Lack, G., Mattelio, G., Renz, H., Sangild, P. T., Schrezenmeir, J., Stulnig, T. M., Thymann, T., Wold, A. E., & Koletzko, B. (2006). Early nutrition and immunity – progress and perspectives. *British Journal of Nutrition*, 96(4), 774–790. <https://doi.org/10.1079/BJN20061917>

(31) Bzikowska-Jura, A., Czerwonogrodzka-Senczyna, A., Olędzka, G., Szostak-Węgierek, D., Weker, H., & Wesołowska, A. (2018). Maternal Nutrition and Body Composition During Breastfeeding: Association with Human Milk Composition. *Nutrients*, 10(10).

<https://doi.org/10.3390/nu10101379>

(32) Hassiotou, F., Hepworth, A. R., Metzger, P., Tat Lai, C., Trengove, N., Hartmann, P. E., & Filgueira, L. (2013). Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clinical & Translational Immunology*, 2(4), e3.

<https://doi.org/10.1038/cti.2013.1>

(33) de Quental, O. B., França, E. L., Honório-França, A. C., Morais, T. C., Daboin, B. E. G., Bezerra, I. M. P., Komninakis, S. V., & de Abreu, L. C. (2019, November 15). Zika Virus Alters the Viscosity and Cytokines Profile in Human Colostrum [Research Article]. *Journal of Immunology Research; Hindawi*. <https://doi.org/10.1155/2019/9020519>

(34) World Health Organization. (2016). Obesity and overweight.

<https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/obesity-and-overweight>

- (35) Morales, P. A. K., González, M. G. V., & Kalb, M. M. Y. (2016). Encuesta Nacional de Salud Pública y Nutrición de Medio Camino 2016. Instituto Nacional de Salud Pública, 151.
- (36) Vega-Robledo, G. B., & Rico-Rosillo, M. G. (2019). Adipose tissue: Immune function and alterations caused by obesity. *Revista Alergia México (Tecamachalco, Puebla, México: 1993)*, 66(3), 340–353. <https://doi.org/10.29262/ram.v66i3.589>
- (37) Lynch, L., Michelet, X., Zhang, S., Brennan, P. J., Moseman, A., Lester, C., Besra, G., Vomhof-Dekrey, E. E., Tighe, M., Koay, H.-F., Godfrey, D. I., Leadbetter, E. A., Sant'Angelo, D. B., von Andrian, U., & Brenner, M. B. (2015). Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nature Immunology*, 16(1), 85–95. <https://doi.org/10.1038/ni.3047>
- (38) Hotamisligil, G. S. (2017). Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*, 542(7640), 177–185. <https://doi.org/10.1038/nature21363>
- (39) Kathleen M Rasmussen (2004) Prepregnant overweight and obesity diminish the prolactin response to suckling in the first week postpartum, *Pediatrics*. 2004 May;113(5): e465-71
- (40) Hassiotou F, Geddes DT, Hartmann PE: Cells in human milk: state of the science. *J Hum Lact* 29(2):171–182
- (41) Yoshimura, A., Ohnishi, S., Orito, C., Kawahara, Y., Takasaki, H., Takeda, H., Sakamoto, N., & Hashino, S. (2015). Association of Peripheral Total and Differential Leukocyte Counts with Obesity-Related Complications in Young Adults. *Obesity Facts*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1159/000373881>
- (42) Cunningham F. G. (2009) Laboratory Values in Normal Pregnancy, *The American College of Obstetricians and Gynecologist*, vol. 114, no. 6 december 2009
- (43) Trend, S., de Jong, E., Lloyd, M. L., Kok, C. H., Richmond, P., Doherty, D. A., Simmer, K., Kakulas, F., Strunk, T., & Currie, A. (2015). Leukocyte Populations in Human

Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry. *PloS One*, 10(8), e0135580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135580>

(44) Suomalainen J. (2002) Leucocytes in human milk and lymphocyte subsets in cow's milk-allergic infants, *PediatrAllergyImmunol*2002:13:243–254

(45) Lewis E. D. (2016) the importance of human milk for immunity in preterm infants, *clinics in perinatology*, volume 44, issue 1, p23-47, march 01, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.008>

(46) Lima, J., Martins, C., Leandro, M. J., Nunes, G., Sousa, M.-J., Branco, J. C., & Borrego, L.-M. (2016). Characterization of B cells in healthy pregnant women from late pregnancy to post-partum: A prospective observational study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 16(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12884-016-0927-7>

(47) Veenstra van Nieuwenhoven, A. L., Bouman, A., Moes, H., Heineman, M.-J., de Leij, L. F. M. H., Santema, J., & Faas, M. M. (2002). Cytokine production in natural killer cells and lymphocytes in pregnant women compared with women in the follicular phase of the ovarian cycle. *Fertility and Sterility*, 77(5), 1032–1037. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)02976-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)02976-X)

(48) Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 2005;135(1):1–4.

(49) Polin, R (2017). Mononuclear Phagocyte System. En R. Polin (Ed), *Fetal and Neonatal Physiology* (5 ed, 1 vol, pp. 1208-1215) Elsevier

(50) Lizard, G., Fournel, S., Genestier, L., Dhedin, N., Chaput, C., Flacher, M., Mutin, M., Panaye, G., & Revillard, J. P. (1995). Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry*, 21(3), 275–283. <https://doi.org/10.1002/cyto.990210308>

(51) BHASKARAM P. (1981) bactericidal activity of human milk leukocytes, *Acta Pzdiatr Scand* 70: 87-90, 1981

(52) Spinola, A. (2014). Are Basophils and T helper 2 Cells Implicated in Mastocytosis? *Journal of Allergy & Therapy*, 05(05). <https://doi.org/10.4172/2155-6121.1000192>

- (53) Scott, E. M., Solomon, L. A., Davidson, C., Storie, J., Palikhe, N. S., & Cameron, L. (2018). Activation of Th2 cells downregulates CRTh2 through an NFAT1 mediated mechanism. *PLOS ONE*, 13(7), e0199156.
- (54) Peroni, D. G. (2013). Colostrum-derived B and T cells as an extra-lymphoid compartment of effector cell populations in humans. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 26(2), 137–142.
- (55) Kataoka, N., Satoh, T., Hirai, A., Saeki, K., & Yokozeki, H. (2013). Indomethacin inhibits eosinophil migration to prostaglandin D2: Therapeutic potential of CRTH2 desensitization for eosinophilic pustular folliculitis. *Immunology*, 140(1), 78–86. <https://doi.org/10.1111/imm.12112>
- (56) Metcalfe, D. D. (2016). Biomarkers of the involvement of mast cells, basophils and eosinophils in asthma and allergic diseases. *World Allergy Organization Journal*, 9, 7. <https://doi.org/10.1186/s40413-016-0094-3>
- (57) Braakman, E. (1992). CD16 on human gamma delta T lymphocytes: Expression, function, and specificity for mouse IgG isotypes. *Cellular Immunology*, 143(1), 97–107. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(92\)90008-d](https://doi.org/10.1016/0008-8749(92)90008-d)
- (58) Fossati, G. (2002). Differential role of neutrophil Fcγ receptor IIIb (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes. *Arthritis and Rheumatism*, 46(5), 1351–1361. <https://doi.org/10.1002/art.10230>
- (59) Marsán Suárez, V., Macías Abraham, C., Díaz Domínguez, G., Morales Garrido, Y., Lam Díaz, R., Machín García, S., González Otero, A., Fernández Nodarse, R., Cedré Hernández, T., & Valdés Sojo, C. (2017). Expresión del antígeno CD45 en la Leucemia Linfocítica aguda Pediátrica. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 33(2).
- (60) Courtney, A. H. (2019). CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells. *Science Signaling*, 12(604). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw8151>
- (61) Gao, H. (2000). Effects of the protein tyrosine phosphatase CD45 on FcγRIIIa signaling and neutrophil function. *Experimental Hematology*, 28(9), 1062–1070. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(00\)00513-0](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(00)00513-0)

(62) Patterson, W. P., Caldwell, C. W., & Yesus, Y. W. (1993). In Vivo Upregulation of CD45RA in Neutrophils of Acutely Infected Patients. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 68(1), 35–40. <https://doi.org/10.1006/clin.1993.1091>

(63) Jeurink, P. V. (2013). Human milk: A source of more life than we imagine. *Beneficial Microbes*, 4(1), 17–30. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0040>

(64) Blaylock, M. G.(2003). Eosinophils from patients with asthma express higher levels of the panleucocyte receptor CD45 and the isoform CD45RO. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 33(7), 936–941. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01697.x>

Curriculum

Datos de generales

Dr. Jorge Luis Moreno Vázquez

Dirección: Rincón de la cima #309, Colonia Rincón de las Cumbres, Monterrey Nuevo León

Numero de contacto 8113239577 Sexo: Masculino Edad 32 años

Fecha de nacimiento 15/10/1986

Email: dr.jorgem@hotmail.com

Estudios realizados

Bachillerato: Instituto Regiomontano A.C. junio 2003- enero 2006

Universitario: Médico Cirujano Partero, Universidad Autónoma de Nuevo León, agosto 2006- junio 2012

Especialidad en Pediatría: Universidad Autónoma de Coahuila, Hospital Infantil de Torreón, marzo 2015 – febrero 2019, jefe de residentes

Subespecialidad en Neonatología: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Programa Multicéntrico de Especialidades Médicas, marzo 2019- febrero 2022, jefe de residentes

Experiencia Laboral:

Jefe de área médica en campo de fuerza civil, secretaria de Seguridad Pública (2013-2014)

Servicio Social: Ejido el Barranquito, Cadereyta Nuevo León, 2011-2012

Cursos y Actividades extracurriculares

Reunión de actualización en pediatría del Hospital del Niño Dr. Federico Santos, Saltillo Coahuila Zaragoza 6,7 y 8 de octubre 2016

Primer lugar en la presentación de caso clínico en la reunión de actualización en pediatría del Hospital del Niño Dr. Federico Gómez Santos, Saltillo Coahuila Zaragoza, octubre 2016

Participación en la jornada medica “Hospital Guadalupano A.C.” Parras de la Fuente 20 de mayo del 2017

Ponencia en la conferencia “Cáncer Infantil” para la organización “destapa una esperanza” septiembre 2017

Ponente de las Jornadas Académicas Nacionales de Médicos Residentes con el tema “Factores de riesgo maternos y perinatales para el desarrollo de lesión renal aguda en del recién nacido del Hospital Infantil Universitario” 11 de octubre 2018

Coautor de articulo: Varicela complicada con gangrena de Fournier asociada con el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), revista de enfermedades infecciosas y microbiología, órgano de la asociación mexicana de infectología y microbiología clínica AC, septiembre 2018 pagina 93-98

Idiomas

Ingles 575 puntos en TOEFL ITP