



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SECRETARIA DE SALUD

HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

DIVISIÓN DE PEDIATRÍA

**CARACTERÍSTICAS INMUNOLÓGICAS DE LA LECHE MATERNA
DE MUJERES CON PARTOS A TÉRMINO Y PRETÉRMINO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:

ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA

PRESENTA:

DRA. GRACIELA SAN VICENTE GONZÁLEZ

ASESOR: DR. ALFREDO ULLOA RICARDEZ

MÉXICO, D. F

24 DE JULIO DEL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACION DE TESIS

**DR. CARLOS VIVEROS CONTRERAS
TITULAR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA**

**DR. JORGE ALBERTO DEL CASTILLO MEDINA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO UNIVERSITARIO DE
ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA**

**DR. ALFREDO ULLOA RICARDEZ
JEFE DEL SERVICIO DE NEONATOLOGÍA
ASESOR DE TESIS**

**DR. EN C. MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN
ASESOR DE TESIS**

REGISTRO DE TESIS: HJM 2515/15-R

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a Dios por darme esta gran oportunidad y por enseñarme que a por arriba de todo lo médicamente posible está Él, que los milagros ocurren todos los días frente a nuestros ojos y que Él sabe cuándo y porqué pasan las cosas. Gracias a mi familia y a mis abuelitas que desde el cielo se q están orgullosas de mí y que me han acompañado en cada paso. Y sobre todo gracias a mis padres, porque sin su apoyo no hubiera podido llegar a este momento. Gracias a mis maestros y a los mismos pacientes por que gracias a ellos aprendemos no sólo académicamente sino a ser mejores seres humanos.

INDICE.

Resumen	5
Introducción	6
Justificación	17
Pregunta de Investigación	20
Objetivos	21
Material y métodos	22
Consideraciones éticas	26
Resultados	27
Discusión	36
Conclusiones	38
Referencias Bibliográficas	39
Anexos	
Hoja de recolección de datos	42
Cronograma de actividades	43
Glosario	44
Abreviaturas	46

RESUMEN.

La lactancia materna es la forma ideal de aportar a los niños pequeños los nutrientes que necesitan para un crecimiento y desarrollo saludables. Prácticamente todas las mujeres pueden amamantar, siempre que dispongan de buena información y del apoyo de su familia y del sistema de atención de salud.

La leche materna es inocua; sin embargo, no sólo debe ser considerada como la fuente principal de alimento para el bebe sino como proveedora de inmunidad. A través de la leche materna se transfieren componentes humorales y células de estirpe inmunológica al neonato lactante que lo protege de las enfermedades más frecuentes en la infancia como la diarrea y la neumonía, que son las dos causas principales de mortalidad en la niñez alrededor del mundo. El avance en el conocimiento de los mecanismos inmunitarios tanto humorales como celulares ha cambiado notablemente, en los años 70 se empezó a caracterizar los componentes humorales (anticuerpos) que se encontraban presentes en la leche materna, sin embargo, actualmente se sabe que además de anticuerpos se encuentran células de estirpe inmunitaria, en los primeros estudios se han identificado linfocitos y macrófagos, pero aún se desconoce su participación y como estas células pueden proveer de inmunidad al neonato. El presente estudio se evaluarón el porcentaje de las sub-poblaciones de linfocitos T cooperadores (Th) Th1, Th2, Th17 y linfocitos T reguladores (Treg) y las sub-poblaciones de linfocitos B mediante Citometría de Flujo Multiparamétrica en los diferentes estadios de maduración de la leche materna de madres con nacimientos a término y pretérmino.

INTRODUCCIÓN.

Durante los últimos decenios se han seguido acumulando pruebas sobre las ventajas sanitarias de la lactancia materna, sobre la que se han elaborado numerosas recomendaciones. La OMS puede afirmar ahora con plena seguridad que la lactancia materna reduce la mortalidad infantil y tiene beneficios sanitarios que llegan hasta la edad adulta.

La leche materna es el primer alimento natural de los niños, proporciona toda la energía y los nutrientes que necesitan durante sus primeros meses de vida y sigue aportándoles al menos la mitad de sus necesidades nutricionales durante la segunda mitad del primer año y hasta un tercio durante el segundo año de vida **(1)**.

La leche materna promueve el desarrollo sensorial y cognitivo, además de proteger al bebé de enfermedades infecciosas y crónicas. La lactancia natural exclusiva reduce la mortalidad infantil por enfermedades de la infancia, como la diarrea o la neumonía, y favorece un pronto restablecimiento en caso de enfermedad. Así mismo, menor prevalencia de desordenes inflamatorios del intestino (Crohn), diabetes tipo I, en neonatos e infantes alimentados al seno materno; comparado a grupos de niños no alimentados. Además la lactancia natural contribuye a la salud y el bienestar de la madre, ayuda a espaciar los embarazos, disminuye el riesgo de cáncer ovárico y mamario, incrementa los recursos de la familia y el país, es una forma segura de alimentación y resulta inocua para el medio ambiente **(2)**.

La leche materna es un fluido biológico complejo y específico para las necesidades del neonato compuesto por lípidos, carbohidratos, minerales, proteínas (muchas de las cuales se sabe tienen propiedades inmunológicas) y moléculas con bioactividad (como vitaminas y factores inmunomoduladores) **(3)**.

CLASIFICACIÓN DE LA LECHE HUMANA.

La leche puede ser clasificada en tres estadios como: calostro, leche de transición y leche madura, de acuerdo a su composición y tiempo en la cual se produce. Cada uno de estos tipos de leche expresa concentraciones diferentes de nutrientes y esta composición depende directamente de la condición nutricional de la madre durante el embarazo y de la alimentación en el transcurso de la lactancia.

El calostro se produce los primeros cuatro días después del parto, es un líquido amarillento por la presencia de beta-carotenos, tiene alta densidad, contiene una menor cantidad de lactosa, lípidos y vitaminas hidrosolubles comparada con la leche madura. Aporta una gran cantidad de proteínas (inmunoglobulinas y lactoferrina), vitaminas liposolubles, sodio, zinc y una gran cantidad de linfocitos y macrófagos **(4)**.

Día	IgA (mg/100 mL)	IgG (mg/100 mL)	IgM (mg/100 mL)
1	600	80	125
2	260	45	65
3	200	35	58
4	80	16	30

Tabla 1.- Concentración de inmunoglobulinas en calostro

La leche de transición se produce entre el cuarto y catorce días posparto, esta leche presenta un aumento del contenido de lactosa, lípidos, carbohidratos y vitaminas hidrosolubles y una disminución en las proteínas y vitaminas liposolubles. Estos cambios ocurren bruscamente, y se estabilizan alrededor de los 14 días, en esta etapa se producen de 600 a 750 ml por día **(4)**.

La leche madura se produce a partir del día catorce en un volumen promedio de 700 a 800 ml por día y sus principales componentes son agua, carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos libres, que el recién nacido no es capaz de sintetizar, necesaria para conjugar los ácidos biliares y funcionar como neurotransmisor. También se encuentran presentes las inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM **(4)**.

Existen asimismo, otras proteínas en concentraciones bajas, tales como enzimas moduladores del crecimiento y hormonas.

- Lisozimas: Son factores antimicrobianos no específicos, con acción bactericida contra entero bacterias y bacterias Gram positivas.
- Vitaminas: La leche humana contiene todas las vitaminas. Existen variaciones en las hidrosolubles, dependiendo de la dieta de la madre.
- Minerales y elementos traza: Las cantidades que se encuentran son suficientes para las necesidades del lactante.

Vitamina (µg)	Calostro	Leche madura
A	151	75
B1	1.9	14
B2	30	40
Ac. nicotínico	75	160
B6		12-15
Ac. pantoténico	183	246
Biotina	0.06	0.6
Ac. fólico	0.05	0.14
B12	0.05	0.1
C	5.9	5
D	--	0.04
E	1.5	0.25
K	--	1.5
Energía Kcal.	57	65
pH	--	7.0

Tabla 2.- cantidad total de vitaminas en calostro y leche madura.

La leche pre término se producen durante los primeros meses con un contenido mayor de sodio, proteínas y lactoferrina; sin embargo contiene menor cantidad de lactosa, calcio y fósforo por lo que estas sustancias deben ser suplementadas **(3)**.

PROPIEDADES INMUNOLÓGICAS DE LA LECHE MATERNA.

La lactancia materna mantiene el vínculo inmunológico materno-fetal después del nacimiento, puede favorecer la transmisión de la inmunocompetencia de la madre a su bebé, y se considera un importante factor que contribuye al sistema de defensa inmune neonatal durante un período delicado y crucial para el desarrollo inmunológico. Varios estudios han informado que la lactancia materna, debido a la actividad antimicrobiana frente a varios virus, bacterias y protozoos, puede reducir la incidencia de la infección de los recién nacidos.

La lactancia materna proporciona la protección más eficiente para el neonato mientras su sistema inmune se desarrolla, incluyendo una extensa variedad de moléculas con funciones inmunoprotectoras **(5)**. Estas moléculas comprenden IgA, ácidos grasos, lactoferrina, α -lactoalbúmina, lisosima, oligosacáridos, citocinas y antioxidantes, por nombrar algunas **(6)**. Por lo que podemos clasificar a los componentes inmunitarios por su naturaleza en 2 tipos: celulares y humorales.

Humorales	Imunoglobulinas secretorias ▶ IgA ▶ IgG ▶ IgM ▶ Factor bífido Lisozima Interferón Factores del complemento Lactoferrina'
Celulares	Macrófagos Polimorfonucleares Neutrófilos Linfocitos B Linfocitos T Células epiteliales

Tabla 3.- Componentes humorales y celulares presentes en la leche materna.

COMPONENTES HUMORALES PRESENTES EN LA LECHE HUMANA.

LACTOFERINA

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína que se encuentra en las secreciones exocrinas, sangre y leucocitos. Compete por el hierro con microorganismos dependientes del hierro, especialmente *E. Coli*, resistente a la actividad proteolítica. **(7)**.

LISOZIMA

La lisozima humana es un polipéptido compuesto por 125 aminoácidos con un peso molecular de 14,000 Da, su actividad consiste en hidrolizar la pared bacteriana al romper la unión β 1-4 de los proteoglicanos, activar las autolisinas bacterianas y bloquear la adherencia entre otras. La concentración en leche materna varía durante la lactación de 80 μ g/mL durante los primeros días, cae a 25-30 μ g/mL al mes, y se incrementa hasta 245 μ g/mL después de los 6 meses de lactación **(7)**.

INMUNOGLOBULINAS

La principal inmunoglobulina es la IgA; su función consiste en proteger a través de neutralización de toxinas y/o factores de virulencia (patógenos), inmovilización de adherencia a las células epiteliales de las mucosas del recién nacido. La mayor parte de la IgA es producida por el mecanismo bronco-entero-mamario como reacción a los gérmenes con los que la madre ha tenido contacto. Esta inmunoglobulina también es producida en la glándula mamaria **(4)**. La IgA de secreción es más resistente a la digestión de proteasas del intestino (tripsina, y quimiotripsina) comparada a otras inmunoglobulinas (IgM, IgG). La subclase (IgA2) es alta en leche materna. También se encuentran presentes inmunoglobulinas IgG, IgM en menores cantidades **(8)**.

Día	IgA (mg/100 mL)	IgG (mg/100 mL)	IgM (mg/100 mL)
1	600	80	125
2	260	45	65
3	200	35	58
4	80	16	30

Tabla 4.- Concentración de inmunoglobulinas en calostro

FACTOR BÍFIDO

El factor bífido es un carbohidrato específico que en presencia de lactosa promueve la colonización intestinal por lactobacilo acidófilo, este a su vez genera un pH ácido el cual dificulta el desarrollo de *E. coli* y hongos como *Candida albicans* **(8)**.

INTERFERÓN

Son un grupo de potentes estimuladores de la citotoxicidad de los leucocitos en ausencia de anticuerpos, con una potente actividad antiviral **(9)**.

CITOCINAS

Los niveles de citocinas se determinaron a ser alta en el calostro y la leche transitoria de las madres de los recién nacidos pre-término, mientras que sus niveles se han reducido drásticamente en el día 21, pero los niveles de citoquinas fueron significativamente menores en comparación con el calostro de madres de recién nacidos maduros **(10)**.

COMPONENTES CELULARES PRESENTES EN LA LECHE HUMANA.

Estudios epidemiológicos realizados en los últimos 30 años apoyan fuertemente el hecho de que la alimentación provista por el seno materno evita infecciones en los neonatos, sobre todo aquellas que afectan al tracto gastrointestinal y al respiratorio. Las células de la leche materna comprenden los macrófagos, los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los linfocitos "B" y "T". Sin embargo, de la actividad de los elementos celulares de la leche se sabe todavía muy poco.

LEUCOCITOS

La leche materna también contiene leucocitos derivados del torrente sanguíneo que se cree son transportados a la leche por la vía paracelular. El contenido de leucocitos del calostro varía entre un 13.2 – 70.4% de las células totales (10,000-13,000,000 células por mL). La población de leucocitos de la leche materna incluye granulocitos, linfocitos, monocitos y macrófagos.

MACRÓFAGOS

Son las células que están en mayor cantidad (80%) y contienen a su vez IgA, lisozima y lactoferrina **(8)**. La concentración de todos estos elementos es mayor en el calostro que en la leche madura, pero se compensa por el mayor volumen de leche, de manera que la cantidad total se mantiene relativamente constante durante toda la lactancia. Las actividades de los macrófagos se han demostrado tanto en el calostro fresco como en el cultivo de células calostrales **(11)**.

POLIMORFONUCLEARES

Son células con marcada actividad fagocítica y que se encuentran en la leche materna normalmente en cantidades mínimas. Las funciones asociadas con la fagocitosis son limitadas en relación con los granulocitos neutrófilos periféricos. El calostro contiene alrededor de 10^5 a 5×10^6 leucocitos/mL, de los cuales del 40 al

60 % son polimorfonucleares. En la leche madura el número de células es menor, alrededor de 105 leucocitos/mL con el 20-30 % de polimorfonucleares **(12)**.

LINFOCITOS

Los linfocitos son células que reconocen a los antígenos extraños de manera específica y responden contra ellos, por lo que constituyen los mediadores de la inmunidad humoral y celular. Existen distintas subpoblaciones que difieren en la forma de reconocer el antígeno y sus funciones. De la población de linfocitos, un 83% son linfocitos T y un 4 – 6% son linfocitos B **(3)**.

LINFOCITOS B

Son las únicas células capaces de producir anticuerpos. Reconocen los antígenos extracelulares incluso sobre su propia superficie y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos por loe que actúan como mediadores de la inmunidad humoral **(15)**.

Existen diferentes subpoblaciones de linfocitos B maduros con capacidades para producir anticuerpos: **(13)**

- 1) Linfocitos foliculares también conocidos como linfocitos B foliculares, linfocitos B2 o linfocitos B0.
- 2) Linfocitos B de zona marginal esplénica.
- 3) Linfocitos B1

En la leche materna término comprenden una pequeña parte del total de las células presentes en la leche materna y pueden ser identificadas por la presencia de inmunoglobulinas de superficie marcadas como IgA, IgG e IgM.

El 50 % de los linfocitos B de la leche materna presentan anticuerpos IgA en su superficie, mientras que en la sangre la proporción es del 17 %. En estudios realizados sobre el efecto de la leche materna en la función de los linfocitos B demostraron que el calostro desnatado, filtrado y libre de células, al igual que la

leche madura exhibe un aumento en la proliferación y generación de la secreción de anticuerpos de los linfocitos B. Esto sugiere un mecanismo inmunológico importante **(14)**.

LINFOCITOS T

Los linfocitos T regulan la inmunidad celular, reconocen los antígenos de los patógenos intracelulares y sirven para destruir a dichos microorganismos o a la célula infectada, estas células presentan una afinidad restringida hacia los antígenos, reconocen a los antígenos asociados a una superficie celular pero no a los antígenos solubles.

Los linfocitos T tienen subclases como: **(15)**.

1. Linfocitos T cooperadores (CD4) se pueden diferenciar en:

- Linfocitos T_H1 (secretan TNF- γ).
- Linfocitos T_H2 (secretan IL-4 e IL-5).
- Linfocitos T_H17 (secretan IL-17).

2. Linfocitos T citotóxicos (CD8) liberan granzimas y perforina

Aunque se desconoce la función de los linfocitos T en la leche materna, se infiere que contribuyen a la defensa de las glándulas mamarias contra infecciones virales **(16)**. Los linfocitos T de la leche materna, en comparación con los linfocitos T sanguíneos, presentan disminución de la proliferación frente a diferentes señales de activación y mínima citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos **(17)**.

Los linfocitos T pueden ser cooperadores (CD4+) o citotóxicos (CD8+). La vía de activación de los linfocitos T CD4+ vírgenes determina la producción de células efectoras dotadas de diferentes perfiles funcionales. Las células efectoras Th1 producen IFN- γ e inducen la activación de macrófagos. Las células efectoras Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-13, e inducen la movilización y activación de eosinófilos y mastocitos, favoreciendo la producción de anticuerpos de clase IgE. Las células efectoras Th 17 producen IL-17, IL-21 e IL-22 y promueven la producción,

movilización e infiltración de neutrófilos. Las células Th1 y Th17 median el desarrollo de patologías autoinmunes, mientras que las células Th2 cumplen un papel clave en el desarrollo de los fenómenos alérgicos.

Los linfocitos T reguladores (Treg), por su parte, median un efecto supresor sobre la activación de las diferentes poblaciones de linfocitos T y sobre los linfocitos B, a fin de controlar la actividad de las clonas de T y B autorreactivas presentes en la periferia y modulan el desarrollo de la respuesta inmunitaria antiinfecciosa **(19)**.

Los linfocitos T CD8+ suelen mostrar menor plasticidad que los linfocitos T CD4+. La activación de los linfocitos T CD8+ vírgenes conduce a la producción de células efectoras con dos funciones principales; citotoxicidad y producción de citocinas inflamatorias **(18)**.

Se ha descrito que los leucocitos presentes en la leche materna fresca están activados; lo cual sugiere que le confieren una inmunidad activa al neonato. Por otro lado, se piensa que los leucocitos de la leche materna protegen a la glándula mamaria de infecciones durante la lactancia y se ha descrito que si el neonato está cursando alguna infección se incrementa el número de leucocitos y macrófagos en la leche materna pero cuando se resuelve la infección disminuyen las poblaciones significativamente **(3)**.

CÉLULAS EPITELIALES

Además de su composición bioquímica, la leche materna contiene células de origen materno que se encuentran vivas en la leche fresca, sugiriendo que éstas podrían tener funciones específicas en el neonato. El calostro y la leche de transición frecuentemente contienen más células que la leche madura. Aunque las células maternas son el componente de la leche que más se ha estudiado, se desconocen sus propiedades y las variaciones inter- e intra-individuales **(3)**.

Las células epiteliales son responsables tanto de la estructura como de la función de la glándula mamaria lactante y representan más del 99% del componente celular de la leche materna. La mayoría de las células epiteliales son viables en la leche fresca y pueden ser propagadas en cultivo primario. El desprendimiento de estas células puede ser pasivo debido al estrés asociado con la síntesis y secreción de la leche, la expansión de los lobulillos provocada por la entrada y salida de leche y el vacío aplicado a la glándula mamaria durante la remoción de la leche ya sea por el neonato o por la succión con bomba de vacío. También se ha sugerido que el desprendimiento de las células epiteliales sea debido a un fenómeno activo relacionado con cambios genéticos en las células que modifican su fenotipo, haciéndolas móviles **(3)**.

En la glándula mamaria lactante existen dos tipos de células epiteliales: las células epiteliales que delimitan el lumen del lobulillo, de las cuales unas cuantas se diferencian a lactocitos, y las células epiteliales ductuales que delimitan el lumen de los ductos. Los lactocitos se caracterizan porque expresan proteínas de la leche (como β -caseína, α -lactoalbúmina, lactoferrina), citoqueratina 18 (CK18) y por la presencia de depósitos de grasa. Las células epiteliales ductuales no producen proteínas de la leche y expresan CK19 **(3)**.

Además de las células, también se deben considerar algunos componentes celulares como RNAs de transferencia y microRNAs, que están presentes en la leche materna y son transferidos al neonato embebidos en microvesículas. Que podrían regular la transcripción y expresión génica en el neonato **(18)**.

CONSIDERACIONES EN NUESTRO PAIS DE ACUERDO A LA NORMA OFICIAL MEXICANA (23).

Por lo anterior la OMS recomienda la lactancia materna exclusiva durante seis meses, la introducción de alimentos apropiados para la edad y seguros a partir de entonces, y el mantenimiento de la lactancia materna hasta los 2 años o más.

Para lo cual, toda unidad médica de atención obstétrica deberá tener criterios y procedimientos para la protección y fomento de la lactancia materna exclusiva, atendiendo las condiciones sociales, culturales y laborales de la mujer lactante. Estos criterios y procedimientos deben ser la base para la capacitación del personal e información a las madres.

La atención a la madre durante la lactancia, debe comprender la vigilancia estrecha de la prescripción y uso de medicamentos con efectos indeseables en el niño. El médico responsable de la atención de la madre debe informar al médico responsable de la atención del recién nacido, cuando sean diferentes, del empleo de cualquier medicamento en la madre durante el puerperio.

Las unidades médicas deben ofrecer las condiciones para que las madres puedan practicar la lactancia materna exclusiva, excepto en casos médicamente justificados. Deberá informarse diariamente a embarazadas y puérperas acerca de los beneficios de la lactancia materna exclusiva y los riesgos derivados del uso del biberón y leches industrializadas. No permitiendo la distribución ni la promoción de sucedáneos de la leche materna. Quedando sujeta la entrega y/o indicación de sucedáneos de la leche materna a menores de cuatro meses, únicamente bajo prescripción médica y con justificación por escrito, en las unidades de atención de parto y en las de consulta externa. Quedando lo anterior estipulado en 1981 en el "Código internacional para regular la comercialización de sucedáneos de la leche materna".

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

La leche materna es el alimento ideal para los recién nacidos y los lactantes, pues aporta todos los nutrientes que necesitan para un desarrollo sano. Es inocua y contienen anticuerpos que ayudan a proteger a los lactantes de enfermedades frecuentes de la infancia como la diarrea y la neumonía, que son dos causas principales de mortalidad en la niñez en todo el mundo. La leche materna es un producto accesible lo que garantiza que el lactante tenga alimento suficiente.

Además de los beneficios inmediatos para los niños, la lactancia materna propicia una buena salud durante toda la vida. Los adolescentes y adultos amamantados de niños tienen menos tendencia a sufrir sobrepeso u obesidad. Son también menos propensos a sufrir diabetes de tipo 2 y obtienen mejores resultados en las pruebas de inteligencia.

En los años setenta, emerge el concepto de inmunidad pasiva proveniente de la leche materna; debido a la detección de leucocitos viables e inmunoglobulinas contenidas en la leche materna de humano. Sin embargo es fácil entender la participación de la transferencia de anticuerpo pero se desconoce la participación de las células inmunitarias y como estas pueden proveer de inmunidad al neonato.

Actualmente se cuentan con tecnologías que permiten el análisis de diferentes marcadores intracelulares y de membrana en las células que han logrado clasificar a las poblaciones de linfocitos T de acuerdo a sus funciones como la respuesta Th1, Th2, Th17 y Treg. Por otro lado se encuentra reportado que el recién nacido presenta un estado de inmunosupresión debido a que aún se está desarrollando su sistema inmunitario y la fuente principal de protección es por parte de la madre. Por lo que es necesario conocer los componentes celulares presentes en los diferentes estadios de maduración de la leche en partos a término y pretérmino.

Sin embargo, a pesar de conocerse los múltiples beneficios que la lactancia materna aporta, aún no se conocen completamente las características inmunológicas de la misma en sus diferentes etapas, por lo que este estudio pretende contribuir a comprender las características inmunológicas de la misma en nuestra población.

El presente estudio evaluó el porcentaje de las sub-poblaciones de linfocitos T cooperadores (Th) Th1, Th2, Th17 y linfocitos T reguladores (Treg) y las sub-poblaciones de linfocitos B mediante Citometría de Flujo Multiparamétrica.

El conocimiento generado con la realización de esta investigación abrirá una nueva ventana para la búsqueda de nuevos biomarcadores de buen pronóstico en el desarrollo del neonato.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cuáles serán las características inmunológicas (tipo y cantidad de linfocitos) presentes en las diferentes etapas de la leche materna (calostro, leche de transición y leche materna madura) de recién nacidos prematuros y a término?

OBJETIVOS.

Objetivo general

Identificar y caracterizar fenotípicamente a las sub-poblaciones de linfocitos T, linfocito B y macrófagos durante los estadios de la leche materna de mujeres que tuvieron nacimientos a término y pretérmino mediante citometría de flujo multiparamétrica.

Objetivos particulares

- Cuantificar los linfocitos T (CD25+/CD3+/CD4+/CD8+) y B (CD25+/CD3+/CD45+/CD19+) presentes en los diferentes estadios de la leche materna a término y pretérmino.
- Determinar las sub-poblaciones de linfocitos T (Th1, Th2, Th17 y T reg) y B en los diferentes estadios de la leche materna a término y pretérmino.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio descriptivo, observacional, transversal y prospectivo de las células inmunitarias presentes en los diferentes estadios de la leche materna provenientes de madres con nacimientos a término y pretérmino.

El cual se realizó conforme a los lineamientos de la Declaración de Helsinki, la Ley General de Salud, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la salud y todas las demás disposiciones aplicables, cuyo objeto es evaluar las células del Sistema Inmunitario y componentes humorales presentes en los diferentes estadios de la leche materna provenientes de madres con nacimientos a término y pretérmino.

UNIVERSO DE ESTUDIO

Todas las mujeres lactantes que acudieron al Hospital Juárez de México entre el 1ro de mayo y el 31 de julio del 2015.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Treinta mujeres lactantes que acudieron al Hospital Juárez de México entre el 1ro de mayo y el 31 de julio del 2015.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Mujeres en el inicio de lactancia de 18 a 40 años de edad.
- Mujeres con nacimiento a través de parto o cesárea a término o pretérmino.

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

- Mujeres con alguna inmunodeficiencia primaria o secundaria.
- Mujeres con diagnóstico de cáncer.
- Mujeres con tratamiento con inmunosupresores.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Muestra insuficiente para ser analizada (menos de tres mL).
- Mujeres que durante el estudio presenten alguna patología relacionada con la lactancia.
- Mujeres que decidan retirarse del estudio.

VARIABLES DE ESTUDIO Y SU OPERACIONALIZACIÓN

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO	ESCALA	ESCALA DE MEDICION
Linfocitos T cooperadores	Células que expresan los marcadores CD45+, CD3+ CD4+.	Cuantitativa	Continua	Porcentaje
Linfocitos T citotóxicos	Células que expresan los marcadores CD45+, CD3+ CD8+.	Cuantitativa	Continua	Porcentaje
Linfocitos B	Células que expresan el siguiente fenotipo CD45+, CD3- CD19+.	Cuantitativa	Continua	Porcentaje
Macrófagos	Células del sistema inmune cuya función principal es la fagocitosis y presentación de antígenos. Expresan CD14+.	Cuantitativa	Continua	Porcentaje

INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN Y PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Análisis descriptivo.

Se realizó una descripción de las principales variables recogidas en el estudio, se calcularon medidas de tendencia central y dispersión (media, desviación estándar, mediana, moda, percentiles) para las variables cuantitativas y frecuencias absolutas y relativas para las cualitativas.

Para las variables cuantitativas se aplicó el test t-Student para muestras independientes o Mann-Whitney en caso de no normalidad. Para las cualitativas, el tes chi-cuadrado de Pearson o Fisher para las que no cumplieron los criterios de aplicación. Para comprobar la hipótesis de normalidad de las diferentes variables se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov

Análisis multivariante

Se realizó un análisis mediante regresión logística. Se introdujeron en el modelo las variables que resultaron estadísticamente significativas, además de las clínicamente relevantes. Utilizando el método de selección de variables por pasos sucesivos, considerando en cada paso una probabilidad de entrada de 0.05, y 0.10 para salida.

Para todos los test se consideró un nivel de significación de 0.05. El software estadístico utilizado fue el SPSS 20.0.

Análisis multiparamétrico de las poblaciones y sub-poblaciones de linfocitos y macrófagos.

La muestra de leche materna fue centrifugada para obtener el paquete celular el cual fue lavado en tres ocasiones con 3 mL de solución amortiguada de fosfatos (PBS) y finalmente se re-suspendido en 0.5 mL de PBS y procediendo a realizar el marcaje de moléculas de superficie con diferentes anticuerpos marcados con diferentes fluorocromos en diluciones previamente estandarizadas, siguiendo los procedimientos de operación para el marcaje celular para Citometría de Flujo.

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

RIESGOS DE ESTUDIO.

El presente estudio se encuentra clasificado como de riesgo menor al mínimo, de acuerdo al artículo 17 del Reglamento en Materia de Investigación de la Ley General de Salud, debido a que se empleó una mínima fracción de la leche materna que convencionalmente se recibió del Banco de Leche Materna del Hospital Juárez de México previa aceptación de participar en el estudio bajo información por el Investigador Principal.

MANEJO DE INFORMACIÓN PERSONAL Y MUESTRAS.

Durante el estudio los datos de salud fueron considerados datos personales sensibles. Esta información forma parte del Expediente Clínico general del paciente y fue manejado conforme con la NORMA Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 15 de Octubre del 2012. A su vez, todo el personal médico y científico involucrado en el desarrollo de este estudio obtuvo el deber de confidencialidad respecto de los datos personales de los participantes en el estudio, en particular, sobre aquellos que pudieran facilitar la identificación del titular de los datos personales. El Investigador Principal fue el responsable del tratamiento de los datos personales de los participantes, la cual incluyó la verificación del respeto de confidencialidad por parte de su personal.

El protocolo fue aprobado por el Comité Local de Investigación con el número HJM 2515/15-R.

RESULTADOS.

Se incluyeron 30 mujeres lactantes que acudieron al Hospital Juárez de México entre el 1ro de mayo y el 31 de julio del 201, de entre 18 y 32 años. Dividiéndose en 3 grupos de 10 muestras cada uno, de acuerdo al momento en que se obtuvieron las mismas. En el primer *grupo de calostro* se incluyeron las muestras obtenidas en los primeros 4 días después del parto; en el segundo *grupo leche de transición* aquellas obtenidas entre el cuarto y catorce días posparto, y en el tercer *grupo leche madura* aquellas que se obtuvieron posterior al día catorce.

El primer grupo se conformó de 3 muestras de obtenidas de nacimientos pretérmino y 7 de término, mientras que en los grupos restantes la población fue igualitaria entre pacientes pretérmino y de término.

En el grupo calostro las muestras se obtuvieron de madres entre 18 y 33 años, con un promedio de 22 años, de las cuales el 80% cursó con infección de vías urinarias en las cuales además el 20% presentó cervico vaginitis, 10% enfermedad hipertensiva asociada al embarazo y 10% diabetes estacional. La mitad de los productos se obtuvieron vía abdominal y la otra mitad vía parto vaginal, de entre 29.5 y 41 semanas de gestación (promedio 37.5 SDG), con peso al nacimiento de 1510 a 3670 gramos (promedio 2808 gr), con una distribución igualitaria de sexos, de los cuales 40% se reportaron sanos, 10% cursó con hiperbilirrubinemia multifactorial, 20% sepsis neonatal y 20% restante con patología respiratoria como taquipnea transitoria del recién nacido o síndrome de dificultad respiratoria.

En el grupo de leche transicional la edad materna promedio fue de 26 años, con una mínima de 18 y máxima de 38 años, de las cuales el 50% cursó con infecciones de vías urinarias, 20% cervico vaginitis, 20% diabetes gestacional y 10% epilepsia de origen no especificado. La vía de nacimiento del 40% de los productos de este grupo fue abdominal y el 60% restante vaginal. Obteniéndose productos de entre 29.5 y 41.3 SDG (promedio 36.2 SDG) y peso al nacimiento de 1360 a 3320 gramos (promedio 2486 gr), sin predominio de sexo. De los cuales

10% cursó con asfixia perinatal complicada con enterocolitis necrotizante no perforada, 50% sepsis neonatal y 40% hiper bilirrubinemia multifactorial.

Por último, el grupo de leche madura estuvo conformado por madres de entre 19 y 40 años (promedio 28 años), de las cuales 3 eran sanas, 4 cursaron con infección de vías urinarias, 1 cervico vaginitis, 1 hipertensión asociada al embarazo y 1 ruptura prematura de membranas. Obteniéndose el 60% de los productos vía abdominal y 40% vaginal. Los productos obtenidos obtuvieron un capurro entre 28 y 41 SDG (promedio 35.1 SDG) y peso al nacimiento entre 2000 a 3700 gramos (promedio 2412 gr) sin diferencia de sexo. De los cuales sólo uno de los recién nacidos fue sano, 5 cursaron con hiper bilirrubinemia multifactorial, 2 con sepsis neonatal y 2 con patología respiratoria.

Sin encontrarse diferencias estadísticas entre los tres grupos en cuanto a las características antes descritas.

Se realizó el análisis de las células inmunes en los diferentes grupos que se muestra en la Tabla 5. Existe una mayor cantidad de células inmunitarias en la leche transicional que en las otras ($p = 0.04$), Figura 1. También se encontró mayor cantidad de linfocitos B (CD19+) en la leche transicional que en los otros 2 grupos ($p = 0.02$), Figura 2. En relación a los linfocitos T CD4+ existe una mayor cantidad en la leche madura que en las otros dos estadios se encuentran en mayor cantidad tanto e la leche transicional como en la madura ($p < 0.01$), Figura 3. La presencia de linfocitos T CD8+ no difirió en ninguno de los estadios ($p > 0.05$), Figura 4. Los macrófagos se encuentran en mayor cantidad en la leche transicional que en resto ($p = 0.04$), Figura 5.

En cada grupo se realizó un sub análisis dependiendo si el producto era pre término o de término donde se encontró una mayor cantidad de células inmunes en el grupo de calostro en los recién nacidos de término ($p = 0.03$), Tabla 6. No hubo diferencias en ningún tipo de células inmunes en el grupo de leche transicional ($p = > 0.05$), Tabla 7. Y en la leche madura se encontró mayor cantidad de linfocitos T CD8+ en los recién nacidos de pre término ($p = 0.04$), Tabla 8.

Tabla 5.- Porcentaje de células inmunitarias en los diferentes estadios de leche materna.

		N	Promedio	Desviación Estándar	Valor de p
Células Inmunes CD45+	Calostro	10	20.47	14.09	0.09
	Transicional	10	33.24	17.15	
	Madura	10	36.98	19.07	
	Total	30	30.23	17.82	
Linfocitos B CD19+	Calostro	10	4.49	1.79	0.24
	Transicional	10	8.94	12.13	
	Madura	10	10.80	8.02	
	Total	30	8.07	8.60	
Linfocitos T CD4+	Calostro	10	9.06	5.66	<0.001
	Transicional	10	17.44	12.13	
	Madura	10	28.48	8.42	
	Total	30	18.32	11.96	
Linfocitos T CD8+	Calostro	10	3.46	3.47	0.16
	Transicional	10	5.00	4.47	
	Madura	10	8.60	8.70	
	Total	30	5.69	6.18	
Macrófagos CD14+	Calostro	10	14.56	8.61	0.11
	Transicional	10	22.11	6.63	
	Madura	10	18.63	8.24	
	Total	30	18.43	8.22	

* El valor de p se calculo por t-Student para muestras independientes.

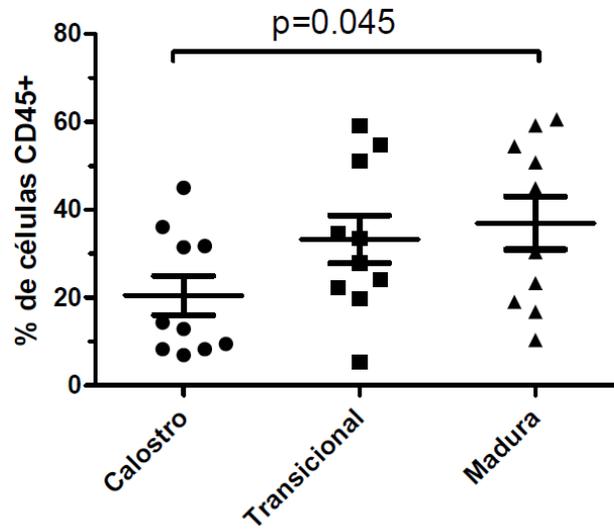


Figura 1. Distribución de células inmunes (CD45+) en los diferentes estadios de la leche materna.

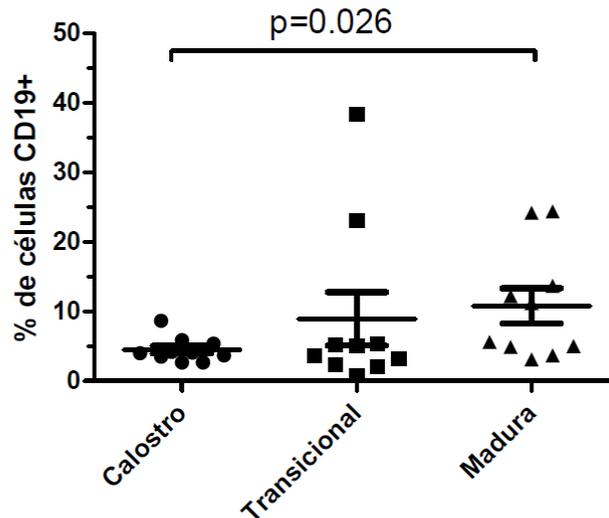


Figura 2. Distribución de linfocitos B (CD19+) en los diferentes estadios de la leche materna.

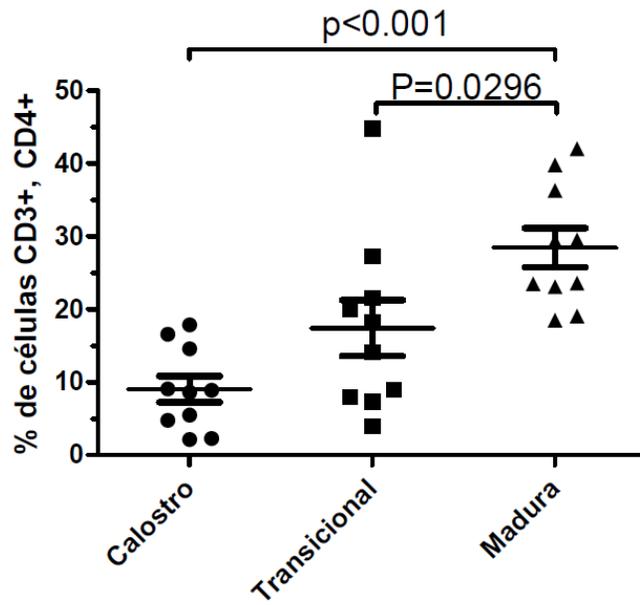


Figura 3. Distribución de linfocitos T cooperadores (CD4+) en los diferentes estadios de la leche materna.

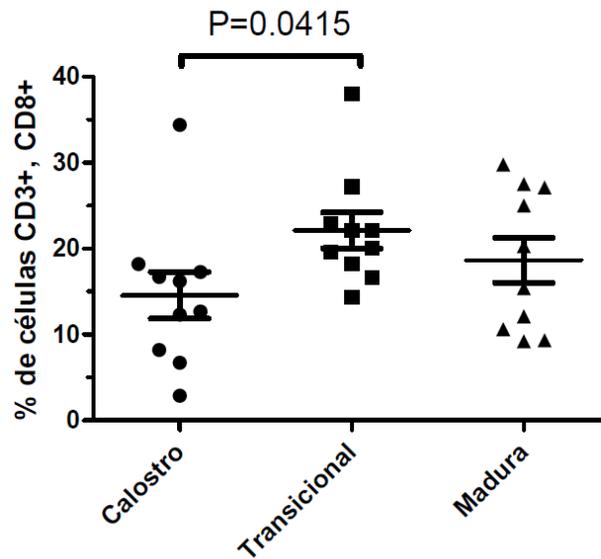


Figura 4. Distribución de linfocitos T citotóxicos (CD8+) en los diferentes estadios de la leche materna.

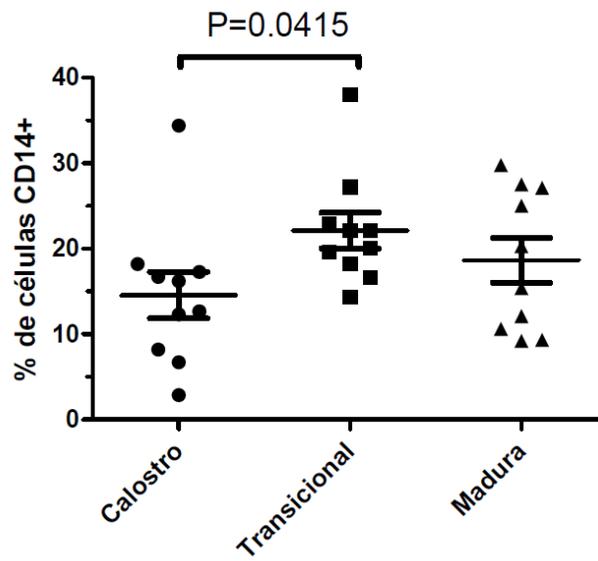


Figura 5. Distribución de macrófagos (CD14+) en los diferentes estadios de la leche materna.

Tabla 6.- Grupo de Calostro

	Recién Nacido	N	Promedio	Desviación Estándar (SD)	Valor de p
Células Inmunes CD45+	Término	7	25.04	14.65	0.03
	Pre término	3	9.82	2.66	
Linfocitos B CD19+	Término	7	4.05	1.23	0.46
	Pre término	3	5.50	2.77	
Linfocitos T CD4+	Término	7	8.84	5.21	0.86
	Pre término	3	9.57	7.90	
Linfocitos T CD8+	Término	7	3.99	4.07	0.50
	Pre término	3	2.25	1.22	
Macrófagos CD14+	Término	7	15.71	9.92	0.55
	Pre término	3	11.87	4.79	

* El valor de p se calculo por t-Student para muestras independientes.

Tabla 7.- Grupo de Transicional

	Recién Nacido	N	Promedio	Desviación Estándar (SD)	Valor de p
Células Inmunes CD45+	Término	5	30.90	12.48	0.69
	Pre término	5	35.59	22.19	
Linfocitos B CD19+	Término	5	3.64	1.83	.0.21
	Pre término	5	14.24	16.05	
Linfocitos T CD4+	Término	5	10.69	6.34	0.07
	Pre término	5	24.19	13.30	
Linfocitos T CD8+	Término	5	3.62	3.46	0.36
	Pre término	5	6.38	5.31	
Macrófagos CD14+	Término	5	24.24	8.98	0.33
	Pre término	5	19.98	2.61	

* El valor de p se calculo por t-Student para muestras independientes.

Tabla 8.- Grupo de Madura

	Recién Nacido	N	Promedio	Desviación Estándar (SD)	Valor de p
Células Inmunes CD45+	Término	5	29.24	17.71	0.21
	Pre término	5	44.72	18.85	
Linfocitos B CD19+	Término	5	14.58	9.51	0.14
	Pre término	5	7.02	4.33	
Linfocitos T CD4+	Término	5	29.44	8.86	0.74
	Pre término	5	27.52	8.88	
Linfocitos T CD8+	Término	5	2.65	1.09	.0.04
	Pre término	5	14.56	8.98	
Macrófagas CD14+	Término	5	17.86	9.92	0.78
	Pre término	5	19.40	7.26	

* El valor de p se calculo por t-Student para muestras independientes.

DISCUSIÓN.

Las funciones de la leche materna son muchas, ya que además del aporte nutricional la leche materna cumple un papel de inmunomodulación en el neonato, es decir, no sólo transfiere una protección contra infecciones y alergias específicas, sino que también estimula el desarrollo del propio sistema inmune del lactante.

Estudios epidemiológicos realizados en los últimos 30 años apoyan fuertemente el hecho de que la alimentación provista por el seno materno evita infecciones en los infantes, sobre todo aquellas que afectan el tracto gastrointestinal y al respiratorio.

Además, en estudios recientes se sugiere que la leche materna y el calostro no sólo proveen protección pasiva, sino que también participan en el desarrollo y maduración del sistema inmunológico del recién nacido mediante factores biológicamente activos **(24)**.

Desde los 70's se descubrió que se transfiere inmunidad a base de la presencia de inmunoglobulinas (anticuerpos) de predominio IgA. Actualmente se sabe que además de la respuesta humoral existen componentes celulares. Los primeros estudios fueron basados en observaciones al microscopio obteniéndose hasta el momento pocos resultados, in embargo, actualmente se cuentan con tecnología que permite la identificación de las mismas a través de marcadores de superficie e intracelulares como es la criometría de flujo multiparamétrica gracias a las cuales se han descrito poblaciones inmunitarias e incluso subpoblaciones de las mismas como se observó en este estudio.

Con este estudio no sólo se logró establecer las características inmunológicas presentes en las diferentes etapas de la leche materna (calostro, leche de transición y leche materna madura), determinando el tipo y cantidad de linfocitos.

Encontrándose una mayor cantidad de células inmunitarias en la leche madura, esto debido a que en las primeras etapas la leche humana en forma de calostro y leche transicional provee primordialmente carbohidratos (lactosa), lípidos, proteínas (lactoferrina) y vitaminas hidrosolubles para mantener las primeras funciones del recién nacido y favorecer una transición adecuada a la vida extrauterina como son el control de su temperatura y alimentación. Siendo hasta después de los 14 días de vida en que la leche humana se produce en mayor cantidad permitiendo incorporar a sus funciones células del sistema inmune que le permitan al recién nacido contar con defensas contra patógenos externos.

Además se identificó que en los recién nacidos de la muestra estudiada no se encontraron diferencias entre los de recién nacidos prematuros y a término, ni en aquellos con madres sanas o portadoras de alguna patología crónica asociada o no al embarazo. Lo que hace suponer que independientemente de los factores de riesgo que tenga el producto la leche humana transmite células del sistema inmune en la misma cantidad para favorecer del desarrollo óptimo del lactante.

Sin embargo, estos estudios citológicos son relativamente nuevos, lo que obliga a continuar realizando pruebas en poblaciones más grandes para poder corroborar lo obtenido en este estudio y poder así seguir aprendiendo de las maravillas que esconde la leche humana mismas que a pesar de los avances biotecnológicos no han podido ser igualadas por ninguna fórmula láctea sintetizada.

CONCLUSIONES.

Aunque aun es difícil entender el papel que podrían tener las diferentes células inmunitarias transferidas de la madre al recién nacido ya que éstas no pueden actuar de manera independiente, sino que al igual que el resto de la respuesta inmune requieren la exposición y posterior presentación del antígeno. por lo que, algunos autores han sugerido que su papel podría ser su participación como moléculas solubles en forma de citocinas que ayudan a mantener un estado de regulación (homeostasis).

En el caso de los macrófagos es más fácil entender su papel pues al ser células del sistema inmune cuya función principal es la fagocitosis y presentación de antígenos no requiere la previa exposición o participación de otros mediadores para realizar su función, actuando como primera línea de ataque protegiendo al recién nacido de la microbiota habitual a la que él está expuesto como es el contacto con su madre y el medio ambiente, previniendo así una infección o enfermedad por los mismos.

En este estudio se permitió corroborar la presencia de macrófagos en la leche humana desde su etapa de calostro con una p significativa 0.03, confirmando que este componente inmunológico que forma parte de la respuesta celular se transmiten de la madre al hijo a través de la leche materna nos permite con certeza establece que la madre provee al recién nacido no solo de inmunidad humoral, lo que nos lleva a seguir indicando la lactancia materna sobre cualquier fórmula láctea sucedánea, por lo que es de suma importancia fortalecer los programas nacionales permitiendo que toda unidad médica de atención obstétrica garantice la protección y fomento de la lactancia materna exclusiva, reduciendo con esto la morbimortalidad en nuestra población pediátrica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

(1) **Walker A.** Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr.* 2010; 156(2 Suppl):S3-7.

(2) **Brandtzaeg P.** Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol.* 2009;70(6):505-15

(3) **Hassiotou and Geddes,** Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge, *Clin Anal* 2013. January ;26 (1): 29-48

(4) **Salud, S. d.,** *Clinicas de lactancia en hospitales infantiles y generales. lineamiento tecnico.* Primera edición ed. México, D. F.: Secretaría de Salud. 2006.

(5) **Goldman AS.** The immune system in human milk and the developing infant. *Breastfeed Med* 2007; 2(4):195-204.

(6) **Molinari CE et al.** Longitudinal analysis of protein glycosylation and b-casein phosphorylation in term and preterm human milk during the first 2 months of location. *BR J NUTR.* 2013, julio 14; 110 (1): 105 - 15

(7) **CASTRO, A. M. & PORRAS VILLALOBOS, M. G.** La protección de leche materna. Una visión actualizada. *REVISTA MEXICANA DE PEDIATRIA*, 2003 70(1), pp. 27-31.

(8) **HANSON, L..** Session 1: Feeding and infant development breast-feeding and immune function.. *Proc Nutr Soc.*, 1983 pp. 96-384.

(9) **Shellhorn.C** LA LECHE HUMANA, COMPOSICION, BENEFICIOS Y COMPARACIÓN CON LA LECHE DE VACA. *Manual de Lactancia para Profesionales de la Salud*, 1995 pp. 1-30.

(9) **Pickering, L..** Human milk humoral immunity and infant defense mechanisms. En: C. C. Thomas, ed. *Human milk and infant nutrition and health.* Springfield: 1986 s.n.

(10) Bilal Ustundag, H. C. Levels of Cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α) and Trace Elements (Zn, Cu) in Breast Milk From Mothers of Preterm and Term Infants. *Mediators of Inflammation*, 2005 Issue 5, p. 331–336.

(11) Lawrence, R. Host-resistance factors and immunological significance of Human Milk. En: L. RA, ed. *Breast feeding: a guide for the medical profession*. St Louis: Mosby: 1989 s.n., pp. 118-47.

(12) LK Pickering, T. C. Polymorphonuclear leukocytes of human colostrum. I. Oxidative metabolism and kinetics of killing of radiolabeled *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 1980, 142(5), pp. 685-93.

(13) Herzenberg Adams S., k. A. origin of murine B cell lineages. *inminol*, 1993. Volumen 11.

(14) Juto, P. Human milk stimulates B cell function. *Arch Dis Child*, 1985 Volumen 60, p. 610.

(15) Abbas Abul K., I. a. H., *Inmunologia celular y molecular*. 6ta ed. filadelfia: elsevier.2010

(16) M Keller, R. K. R. R., *PPD-induced monocyte chemotactic factor*. s.l., Acta Paediar Scand 1984

(17) SS Crago, J. M., 1984. Human colostrum cell. 222(9), p. 86.

(18) Fainboim and Geffner, *Introducciòn a la Inmunologia humana*. Editorial Panamericana 2011, 6ta Ediciòn

(19) Irmak et al. integration of maternal genoma into the neonate genoma through breast milk mRNA transcripts and reverse transcriptase. *Theor Biol Med Model*. 2012 Junio 7;9:20

(20) Bilal Ustundag, H. C., 2005. Levels of Cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α) and Trace Elements (Zn, Cu) in Breast Milk From Mothers of Preterm and Term Infants. *Mediators of Inflammation*, Issue 5, p. 331–336.

(21) Calixto González, R. & González Jiménez, M. A., 2011. Importancia clínica de la leche materna y transferencia de células. *PERINATOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN HUMANA*, 25(2), pp. 109-114.

(22) Franco Coops Patricia, c., 2009. *Diagnóstico y Manejo del Parto Pretérmino*, Mexico D.F: Secretaría de Salud.

(23) Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-1993, Atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio. Diario Oficial de la Federación.México, D.F. Fecha de publicación: 6 de enero de 1995

(24) Rautava S, Walker WA. Academy of Breastfeeding Medicine founder's lecture 2008: breastfeeding--an extrauterine link between mother and child. *Breastfeed Med.* 2009;4(1):3-10.

ANEXO 2

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Actividades	Julio a Octubre 2014	Noviembre 2014 a Febrero 2015	Marzo a Abril 2015	Mayo a Julio 2015
Estandarización de técnicas.	X			
Obtención de muestras.				x
Determinar el porcentaje de células del Sistema Inmunitario mediante citometría de flujo multiparamétrica.				x
Análisis estadístico de los resultados y escritura de artículo.				x

ANEXO 3

GLOSARIO.

- *Edad gestacional*: Duración del embarazo calculada desde el primer día de la última menstruación normal hasta el nacimiento o hasta el evento gestacional en estudio. La edad gestacional se expresa en semanas y días completos

- *Nacimiento*: Expulsión completa o extracción del organismo materno del producto de la concepción, independientemente de que se haya cortado o no el cordón umbilical o esté unido a la placenta y que sea de 21 o más semanas de gestación. El término se emplea tanto para los que nacen vivos como para los mortinatos. Este puede ser vaginal conocido como parto o a través de una incisión abdominal conocido como cesárea.

- *Recién nacido*: Producto de la concepción desde el nacimiento hasta los 28 días de edad.

- *Recién nacido vivo*: Se trata de todo producto de la concepción proveniente de un embarazo de 21 semanas o más de gestación que después de concluir su separación del organismo materno manifiesta algún tipo de vida, tales como movimientos respiratorios, latidos cardiacos o movimientos definidos de músculos voluntarios.

- *Recién nacido pretérmino*: Producto de la concepción de 28 semanas a menos de 37 semanas de gestación.

- *Recién nacido a término*: Producto de la concepción de 37 semanas a 41 semanas de gestación, equivalente a un producto de 2,500 gramos o más;

- *Recién nacido postérmino*: Producto de la concepción de 42 semanas o más de gestación

- De acuerdo con el peso corporal al nacimiento y la edad gestacional el recién nacido se clasifica en:

- De bajo peso (hipotrófico): Cuando el peso resulta inferior de la percentila 10 de la distribución de los pesos correspondientes a la edad gestacional.

- De peso adecuado (eutrófico): Cuando el peso corporal se sitúa entre la percentila 10 y 90 de la distribución de los pesos correspondientes a la edad gestacional.

- De peso alto (hipertrofico): Cuando el peso corporal sea mayor a la percentila 90 de la distribución de los pesos correspondientes a la edad gestacional.

- *Lactancia materna*: La alimentación del niño con leche de la madre.

- *Lactancia materna exclusiva*: La alimentación del niño con leche materna sin la adición de otros líquidos o alimentos, evitando el uso de chupones y biberones.

- *Lactancia materna mixta*: La alimentación proporcionada al niño a base de leche procedente de la madre, más otro tipo de leche o alimento protéico lácteo.

- *Lactancia materna parcial*: Se ofrece al menos un biberón con algún sucedáneo de la leche materna. Esta a su vez se divide en tres categorías: a) alta, más del 80 % es leche materna, b) mediana, 20 a 80 % de los alimentos es leche materna y c) baja, menos del 20 % es leche materna.

- *Sucedáneo de la leche materna*: Todo alimento comercializado presentado como sustituto parcial o total de la leche materna.

ANEXO 4

ABREVIATURAS.

ml	mililitro
Kg	Kilogramos
mmHg	milímetros de mercurio
mts	metros
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Peso
SC	Superficie corporal
T	Talla
NOM	Norma Oficial Mexicana