



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE CORTISOL EN SUERO Y
LECHE HUMANOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
L.N. EMMA MARCELA CENTURIÓN MURILLO

DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. TERESITA DEL NIÑO JESÚS GONZÁLEZ DE COSÍO MARTÍNEZ
[Universidad Iberoamericana](#)
DRA. MARTHA MENJÍVAR IRAHETA
[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Junio, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

La presente tesis fue realizada en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en colaboración con el Hospital Materno Infantil Magdalena Contreras.

Este trabajo fue financiado por el CONACYT (FOSISS 273137) con nombre de proyecto "Impacto nutricional y hormonal materno sobre la concentración de cortisol en la leche humana".

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por la formación académica brindada y por darme la oportunidad de superarme.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en especial al Departamento de Biología de la Reproducción, por haberme permitido realizar el presente trabajo.

Al Hospital Materno Infantil Magdalena Contreras por abrirme las puertas y apoyarme a arrancar el proyecto, así como a su personal de enfermería.

A la Dra. Elena Zambrano González por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí, por sus enseñanzas, su paciencia y su cariño.

A la Q.A. Karen I. Rojas Torres por todo su empeño y dedicación en este proyecto que sin ella no podría haberse llevado a cabo.

Al Dr. Roberto Chavira Ramírez por colaborar ampliamente con nosotros este proyecto en el análisis de hormonas de las muestras.

A la Dra. Lilia Vargas Hernández por su gran apoyo en la realización de este proyecto y por ser puente en la colaboración con el Hospital.

A la Dra. Claudia J. Bautista Carbajal por su apoyo en la capacitación en las técnicas de análisis.

A la Dra. Nancy R. Mejía Domínguez (RAI-CIC-UNAM) por el apoyo en los análisis estadísticos.

A los integrantes del Comité Tutor por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A los integrantes del Jurado, Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dr. Carmen Clapp, Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, Dra. Patricia Ileana Canto Cetina, Dr. Armando Roberto Tovar Palacio, por haberse tomado el tiempo de revisar y evaluar esta tesis y por sus valiosas aportaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada como Estudiante de Maestría para la realización de la presente tesis y por el financiamiento otorgado para el proyecto.

DEDICATORIA

A DIOS, porque sin Él nada de lo que tengo, nada de lo que soy, ni nada de lo que he logrado valdría la pena.

A mis papás Andrea y Javier porque siempre me han apoyado y me han dado lo más valioso que tengo, mi vida y mi familia. Los amo con todo mi corazón. Gracias mamá por estar siempre a mi lado, por escucharme y apapacharme, por ser mi confidente y educarme en la fe, no tengo con qué pagarte todo lo que has hecho por mí (excepto con nietos). Papi, gracias por estar siempre a mi lado, por interceder por mí, por seguir cuidando mis pasos y por los regalos que me haces desde el cielo.

A mi hermanita Ale, porque desde siempre me has cuidado y me has amado –y hecho mucho bullying también-, aunque estés lejos. Te quiero muchísimo y eres mi hermana favorita.

A mi Maxi por apoyarme y estar a mi lado. Gracias por caminar conmigo y compartir sueños. Eres un gran hombre y un gran abogado, me inspiras a ser mejor persona. Te amo mucho, quédate siempre.

A Karen I. Rojas Torres, gracias porque sin ti no podría haber logrado esto, fuiste un apoyo no sólo en el trabajo sino en el aspecto personal, gracias por ser mi amiga y por hacer de mi estancia en el laboratorio algo bonito. “Habrá muchas amistades, pero ninguna tan lechera y tan amante de los bebés como la nuestra”.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Gabriela Lira y a Carlos Ibañez quienes me hicieron sentir acogida desde un inicio.

A mi amiga Ale, por haber sido un apoyo en lo académico y sobre todo para mi corazón.

A Annia, Anita y Adri, gracias por ser mis compañeras en este viaje y sobre todo por su amistad.

A Dianita, Almita e Hilda por bendecirme con su amistad después de tantos años.

A todas las mamás y bebés que compartieron su leche y alegraron mis días de trabajo.

♥¡PAPÁ! ¡HE LLEGADO A LA CÚSPIDE DEL DESEMBRUTECIMIENTO! ♥

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 EL CORTISOL Y SUS FUNCIONES.....	3
2.2 CORTISOL EN EL DESARROLLO	3
2.3 CORTISOL EN LA LECHE MATERNA	4
2.3.1 Papel del cortisol en la leche materna en el desarrollo	
2.3.2 Transferencia de cortisol de la madre a la leche	
2.4 DESARROLLO Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA.....	11
2.4.1 Uniones estrechas en la glándula mamaria	
2.4.2 Papel de las hormonas en la activación secretora y la secreción de leche	
2.4.3 Función de los glucocorticoides en la glándula mamaria	
2.4.4 Glucocorticoides y su función reguladora en la formación de las uniones estrechas durante la transición de calostro a leche madura	
2.5 METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL CORTISOL EN LECHE MATERNA.....	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
4.1 HIPÓTESIS	17
4.2 OBJETIVO GENERAL	17
4.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES	17
5. MÉTODOS	18
5.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD	18
5.1.1 Evaluaciones y permisos otorgados	
5.1.2 Medidas de bioseguridad para los sujetos de estudio	
5.1.3 Medidas de bioseguridad para los investigadores o personal participante	
5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	20
5.2.1 Criterios de inclusión	
5.2.2 Criterios de exclusión	
5.2.3 Criterios de eliminación	

5.3 INSTITUCIONES DE SALUD VINCULADAS	20
5.4 DISEÑO DE LA MUESTRA.....	21
5.4.1 Estrategias para la recolección de datos	
5.4.2 Estandarización de la extracción de leche e identificación del vaciamiento del seno	
5.4.3 Análisis de muestras biológicas	
5.4.3.1 Cuantificación de cortisol en leche	
5.4.3.1.A Inmunoensayo quimioluminiscente (IQ)	
5.4.3.1.B Radioinmunoanálisis (RIA)	
5.4.3.2 Análisis de la composición de la leche humana	
6. RESULTADOS.....	31
6.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	31
6.2 COMPOSICIÓN DE LA LECHE	33
6.3 CORTISOL.....	34
6.3.1 Cortisol en suero por Inmunoensayo Quimioluminiscente (IQ) y Radioinmunoanálisis (RIA)	
6.3.2 Determinación de cortisol en leche mediante Inmunoensayo Quimioluminiscente (IQ)	
6.3.3 Cortisol en suero vs cortisol en leche por Inmunoensayo Quimioluminiscente (IQ)	
6.3.4 Concentración de cortisol por Radioinmunoanálisis (RIA)	
6.3.5 Relación entre la concentración de cortisol en suero y la concentración de cortisol en leche	
6.3.6 Relación entre el cortisol y la composición de la leche	
7. DISCUSIÓN	43
8. RESUMEN DE RESULTADOS	50
9. CONCLUSIONES	51
10. REFERENCIAS.....	51
11. ANEXOS	56
Anexo 1. Carta de consentimiento informado	
Anexo 2. Historia clínica	

Anexo 3. Formato para la toma de medidas antropométricas de la madre y recolección de información antropométrica del niño

Anexo 4. Formato para la toma de la muestra sanguínea de la madre

Anexo 5. Formato para la toma de muestra de leche

1. RESUMEN

El cortisol es una hormona esencial para el desarrollo adecuado en etapas tempranas de la vida. Éste se transfiere del suero a la leche humana, la cual es el principal alimento del niño durante los primeros meses de vida.

Objetivo

Sin embargo, aunque el cortisol se encuentre presente en la leche humana, se desconocen los factores que influyen en su concentración y la relación que guarda con el cortisol en el suero materno. Por lo que el objetivo de este estudio fue investigar si existe una correlación entre la concentración de cortisol en suero materno con la concentración de cortisol en leche en diferentes etapas de la lactancia.

Métodos

Se cuantificó la concentración de cortisol en suero y leche humanos en diferentes etapas de la lactancia por dos métodos: inmunoensayo quimioluminiscente (IQ) y radioinmunoanálisis (RIA). Para determinar la relación entre la concentración de cortisol en suero y leche se realizó un análisis de correlación de Spearman; también se realizó un análisis de regresión lineal para determinar el efecto de la concentración de cortisol en suero y de la etapa de lactancia sobre la concentración de cortisol en leche.

Resultados

Mientras que para la cuantificación de cortisol en suero no hay diferencias entre inmunoensayo quimioluminiscente (IQ) y radioinmunoanálisis (RIA), para la cuantificación de cortisol en leche, el RIA tiene una mayor sensibilidad. Los resultados obtenidos por RIA fueron utilizados para el análisis estadístico. La concentración de cortisol en suero tiene una correlación positiva con la concentración de cortisol en leche ($r_s=0.770$, $P=2 \times 10^{-7}$). Además, de acuerdo al análisis de regresión lineal, la concentración de cortisol en leche depende tanto de la concentración de cortisol en suero como de la etapa de lactancia y de la interacción entre ambos ($F_{1,131}= 165.3505$, $F_{6,131}= 4.0464$, $F_{6,131}= 5.2590$ $P=0.001$).

Conclusiones

Se demostró que la concentración de cortisol en el suero materno tiene una correlación positiva con la concentración de cortisol en leche y que además varía a lo largo de la lactancia. Por lo tanto, la leche funge como un eslabón en la cadena de transmisión de la señal glucocorticoide de la madre al hijo. Además, se consideró al RIA el método óptimo para la cuantificación de cortisol en leche.

2. ANTECEDENTES

El cortisol es el principal glucocorticoide en los humanos y se encuentra involucrado en una gran cantidad de procesos en nuestro organismo. Posee un papel importante en el desarrollo durante las primeras etapas de vida como el embarazo y la lactancia. El momento, la intensidad y la duración de la señal glucocorticoide son esenciales para un desarrollo adecuado y la falta o el exceso de cortisol podría afectar el establecimiento y/o funcionamiento de algunos sistemas o tejidos. El cortisol se encuentra presente en la leche materna y éste podría tener un impacto en el establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HHS), el temperamento, crecimiento, ganancia de peso y desarrollo del niño. El cortisol proviene del suero materno y es transportado dentro del alveolo mamario hacia la leche. Sin embargo, aunque el cortisol esté presente en la leche, se desconocen los factores que influyen en su concentración y la relación que guarda con el cortisol en el suero. Actualmente la información que existe sobre cortisol en leche humana es limitada y con metodología muy variable, además de que no se toman en cuenta las características maternas ni la concentración de cortisol en suero. Por lo cual el propósito de este estudio es investigar si existe una correlación entre la concentración de cortisol en suero y la concentración de cortisol en leche en diferentes etapas de la lactancia, lo que nos ayudaría a profundizar en cómo influyen las condiciones maternas en la composición de la leche y el papel que tiene la leche materna en la transmisión de la señal glucocorticoide de la madre al niño.

2.1 EL CORTISOL Y SUS FUNCIONES

Los glucocorticoides son hormonas esteroides producidas por la corteza de la glándula suprarrenal que se secretan directamente en el torrente sanguíneo en respuesta a diversos estímulos ambientales y biológicos [1]. Su síntesis y secreción están controladas por el eje HHS [2]. En humanos el principal glucocorticoide es el cortisol [1].

Los glucocorticoides en la circulación se encuentran mayormente unidos a proteínas séricas para mantener a la mayoría de éstos en una forma inactiva y poder ser transportados en la sangre; del 80 al 90% de los glucocorticoides están unidos a la transcortina o globulina fijadora de glucocorticoides (CBG) y del 5 al 15% están unidos a la albúmina. Sólo el 5% de los glucocorticoides sistémicos se encuentran libres y tienen bioactividad, es decir, que pueden penetrar a la célula, unirse al receptor y ejercer una respuesta. Por lo tanto, la accesibilidad del cortisol está regulada por la concentración de la CBG [1].

Los efectos que los glucocorticoides producen en las células están mediados por el receptor de glucocorticoides (GR), el cual es miembro de la superfamilia de factores transcripcionales activados por ligando. El GR tiene una estructura modular cuyas principales funciones –como la transactivación, la unión a ADN y la unión a ligandos- están localizadas en dominios específicos [3].

En el adulto los glucocorticoides regulan una gran variedad de procesos como el metabolismo energético, gasto cardíaco, inflamación, inmunidad, alergias, inflamación, inmunidad [2] y desarrollo de la glándula mamaria [4]. Así también, los glucocorticoides juegan un papel crucial en etapas tempranas de la vida como lo es el desarrollo fetal durante el embarazo [2] y la lactancia [5, 6] pudiendo afectar de manera positiva o negativa el establecimiento y/o funcionamiento de ciertos sistemas o tejidos.

2.2 CORTISOL EN EL DESARROLLO

La señalización de glucocorticoides –de origen fetal y materno- durante la gestación es compleja. No sólo son necesarios para preparar al feto a la vida

extrauterina, sino también en el inicio del trabajo de parto [7] y cumplen diversas funciones en el desarrollo post-parto. El momento, la intensidad y la duración de la señal glucocorticoide son esenciales para un desarrollo adecuado [2].

Una excesiva estimulación proveniente de los glucocorticoides podría afectar negativamente el desarrollo y provocar una predisposición al desarrollo de enfermedades en etapas posteriores de la vida. Así también, una deficiente o nula señalización por parte de los glucocorticoides podría producir defectos al nacimiento e incluso la muerte neonatal [2].

2.3 CORTISOL EN LA LECHE MATERNA

La leche materna es el principal alimento para el ser humano durante los primeros meses de vida; ésta se recomienda de forma exclusiva durante los primeros seis meses de vida y como alimento complementario mínimo hasta los dos años de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS). No sólo contiene componentes nutritivos como los macro y micronutrientes, sino que también posee una fracción no nutritiva compuesta por numerosos factores bioactivos con diversas funciones y propiedades antiinfecciosas, inmunológicas, de maduración de órganos, etc. [8]

En la literatura se ha descrito la presencia de diversas hormonas en la leche humana tales como leptina, adiponectina y grelina[9], entre las que también se encuentra el cortisol [10].

Sin embargo, aunque el cortisol esté presente en la leche, se desconoce su comportamiento y los factores que determinan su concentración. La información que existe en la literatura respecto a cortisol en leche humana es limitada, son pocos los estudios que cuantifican a la hormona y la metodología de ellos es muy variada (**Tabla 1**) [10], además de que no se realizan asociaciones con las características maternas ni analizan la relación que tiene con el cortisol presente en el suero materno.

La concentración de cortisol en leche podría estar dictado por diversos factores como el ciclo circadiano, la pulsatilidad de secreción de la hormona, su capacidad

de unión a globulinas transportadoras, la glándula mamaria como barrera selectiva, entre otros.

En el ser humano muchas funciones corporales están regidas por ritmos circadianos y los glucocorticoides muestran uno de los más distintivos. La secreción de cortisol está regulada por el eje HHS [11]. Pundir et al. (2017) cuantificaron la concentración de glucocorticoides (cortisol y cortisona) en leche humana antes y después de cada sesión de amamantamiento durante un periodo de 24 horas a los 3.2 meses de lactancia. Encontraron que estas concentraciones reflejan un patrón de 24 horas, con niveles máximos temprano por la mañana, reflejando el mismo patrón de secreción circadiana de los glucocorticoides en plasma previamente reportado [12]. Sin embargo, no realizaron la cuantificación de glucocorticoides en suero dentro del mismo estudio.

2.3.1 Papel del cortisol en la leche materna en el desarrollo

Los glucocorticoides no sólo son importantes para el desarrollo embrionario y fetal sino que también poseen un rol importante en el desarrollo durante la infancia [13]. Se sabe que los primeros mil días de vida –que corresponden al embarazo y a los primeros dos años de vida extrauterina- son cruciales para el desarrollo [14]. Aunque las glándulas suprarrenales comienzan a funcionar desde la etapa fetal [2] una importante fuente de glucocorticoides durante los primeros dos años de infancia es la leche materna [10].

Los glucocorticoides presentes en la leche materna tienen un impacto en el desarrollo del infante en cuando a un correcto establecimiento del eje HHS, el temperamento [5], el crecimiento y la ganancia de peso [15], además de que podrían estar relacionados con la cantidad de grasa y de proteína de la leche [6].

Respecto al papel que juegan los glucocorticoides en el crecimiento, dado que la lactancia se ha asociado a una menor tasa de sobrepeso y obesidad infantil, Hahn-Holbrook et al. (2016) llevaron a cabo un estudio cuyo objetivo era probar la hipótesis de que la exposición temprana al cortisol en la leche humana ayuda a modular la trayectoria del Índice de Masa Corporal (IMC) infantil durante los

primeros dos años de vida. Para ello determinaron la concentración de cortisol en leche humana a los tres meses de lactancia y utilizaron curvas de crecimiento para examinar si el cortisol era predictivo de los cambios en el IMC en diferentes puntos durante los primeros 24 meses de edad. Sus resultados fueron que los niños expuestos a mayores concentraciones de cortisol en leche a los 3 meses fueron menos propensos a mostrar ganancias de IMC durante los primeros dos años de vida en comparación con aquellos expuestos a menores concentraciones de cortisol. Además, a los dos años los infantes expuestos a mayores concentraciones tenían menor IMC que los otros niños[15].

Por el contrario, Hinde et al. (2015) estudiaron el impacto de los glucocorticoides de la leche materna en las crías de macacos rhesus. Uno de los hallazgos que hicieron respecto al crecimiento fue que concentraciones más elevadas de cortisol en leche se asociaron con una mayor ganancia de peso en las crías a través del tiempo. Cabe destacar que, a diferencia de otros estudios, ellos evaluaron simultáneamente la densidad energética de la leche y el rendimiento ya que, así como los glucocorticoides, los nutrientes tienen efectos simultáneos en el fenotipo de la cría[6].

Aunque en los estudios anteriormente mencionados se obtuvieron resultados distintos, cabe recordar que fueron realizados en diferentes especies. Además, fuera de ellos es poco lo que se sabe sobre el cómo impactan los glucocorticoides provenientes de la leche materna en el crecimiento, ganancia de peso y composición corporal. Por lo tanto, la relación que tienen los glucocorticoides con indicadores de crecimiento y desarrollo aún necesita ser estudiada.

Otra de las formas en las que el cortisol en leche influye en el desarrollo del niño es a través del comportamiento [5], la señalización de los glucocorticoides podría ejercer influencia en el fenotipo conductual [6].

Grey et al. (2013) realizaron un estudio para determinar la relación entre la concentración de cortisol en la leche humana y el temperamento en niños amamantados a los tres meses de edad. Se cuantificó la concentración de cortisol en la leche y cada madre completó el Cuestionario de Comportamiento Infantil

(IBQ por sus siglas en inglés), una medición del temperamento infantil reportada por los padres ampliamente utilizada. Los análisis revelaron una asociación positiva entre la concentración de cortisol y la dimensión de afectividad negativa del IBQ. Además, la asociación positiva entre la concentración elevada de cortisol en la leche y la afectividad negativa se encontraba presente entre las niñas, pero no entre los niños [5]. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la exposición a concentraciones altas de cortisol en la leche humana tiene un impacto en el temperamento y además, éste efecto es dependiente del sexo.

Hinde et al. no sólo estudiaron la relación entre el cortisol en la leche con el crecimiento sino con el temperamento de las crías de macacos rhesus. De hecho, su principal hallazgo fue que los glucocorticoides en la leche materna, independientemente de la energía provista por la leche, predecían un temperamento más nervioso e inseguro tanto en las crías macho como en las hembras [6].

Estos hallazgos sobre cortisol en leche contribuyen a elucidar las vías y mecanismos por los cuáles el cortisol tiene un impacto en el comportamiento y desarrollo neuropsicológico durante la infancia, temas que al ser estudiados no necesariamente contemplan su asociación con la lactancia [13, 16].

Por otra parte, habría que considerar la relevancia clínica del cortisol presente en la leche. Cabe recordar que la mayor parte los glucocorticoides –tanto en la circulación sanguínea como en la leche- se encuentran conjugados, es decir, unidos a proteínas, los cuales son inactivos biológicamente y requieren de sulfatasas y glucoronidasas para ser hidrolizados, activados y absorbidos por la mucosa intestinal. Estas enzimas no se encuentran en el intestino humano al nacimiento y aumentan con la edad debido a la colonización bacteriana [17]. Por lo cual, la concentración de cortisol total en la leche humana podría no representar la cantidad de hormona con relevancia clínica o biológicamente disponible para el niño, especialmente entre menor sea el tiempo transcurrido desde su nacimiento.

2.3.2 Transferencia de cortisol de la madre a la leche

Los componentes bioactivos que se encuentran en la leche materna pueden provenir de diversas fuentes: 1. Pueden ser producidos por la glándula mamaria, 2. Pueden ser producidos por otras células y ser llevados a la leche o 3. Pueden ser tomados del suero materno y atravesar la glándula mamaria, principalmente por vía transcelular y mediado por receptores [8].

Es evidente que el cortisol presente en la leche tuvo que atravesar la glándula mamaria, ya que ésta no produce la hormona. Por lo tanto, existe la posibilidad de que el cortisol sérico sea transportado dentro del alveolo mamario por vía transcelular mediante un proceso de pinocitosis-exocitosis o por vía paracelular mientras las uniones entre las células permanecen abiertas [18] (**Ilustración 1**).

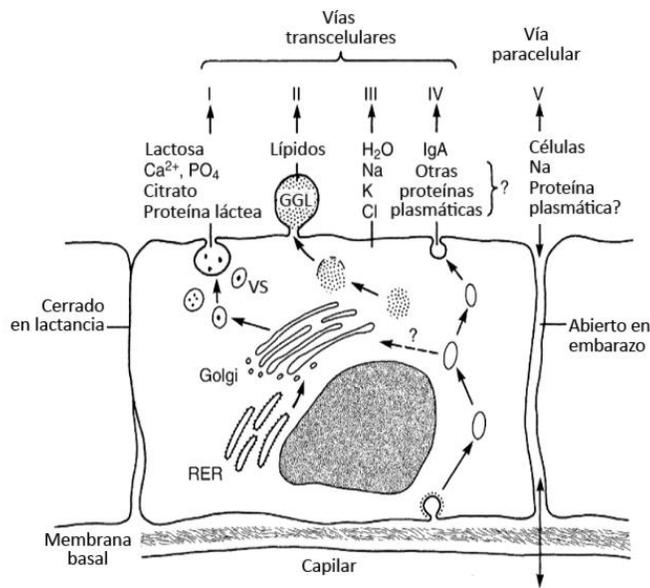


Ilustración 1. Mecanismos para la síntesis de leche y secreción dentro del alveolo mamario. I, Exocitosis de proteína láctea y lactosa en vesículas secretoras derivadas del aparato de Golgi. II, Secreción de grasa láctea a través de glóbulos de grasa. III, Secreción de iones a través de la membrana apical. IV, Pinocitosis-exocitosis (inmunoglobulinas). V, Vía paracelular para componentes plasmáticos y leucocitos. GGL= glóbulo de grasa láctea; RER, retículo endoplásmico rugoso; VS, vesícula secretora. [Modificado de Neville, M.C. (1990). The physiological basis of milk secretion. Part I. Basic physiology. *Ann NY Acad Sci*, 586, pp. 1-11[18]]

Los corticoesteroides sintéticos de uso terapéutico no reflejan una concentración sérica como la de los producidos por el organismo, sin embargo, su administración da pautas para entender la transferencia de glucocorticoides del suero a la leche a través de la glándula mamaria. En general, los corticoesteroides sintéticos no se transfieren muy bien a la leche humana. Después de la administración de dosis

moderadamente altas de prednisona (80 mg), la dosis clínica transferida a la leche fue de sólo 10 µg/Kg, la cual equivale aproximadamente al 10% de la producción endógena [19]. La transferencia de prednisona y prednisolona a la leche se ha visto limitada aún en grandes dosis [20]. Así también con la administración de dosis crónicas de metilprednisolona a mujeres lactantes, no se han observado efectos secundarios en los infantes [21]. Por lo que existe la posibilidad de que a pesar de que haya concentraciones séricas de cortisol muy elevadas, la glándula mamaria actúe como barrera y limite el paso de cortisol hacia la leche como una forma de protección al niño.

De los estudios llevados a cabo hasta el momento sobre cortisol en leche humana, prácticamente no hay información sobre la relación que guarda la concentración de cortisol en suero con la concentración de cortisol en leche. Kulski & Hartman (1981) analizaron la relación entre las concentraciones de cortisol en suero y calostro de 10 mujeres en diferentes etapas del embarazo; la correlación entre la concentración del glucocorticoide en la secreción mamaria y el suero no fue significativa ($r=0.52$, $n=10$). Esto podría no reflejar lo que sucede después del parto, ya que no sólo la concentración de cortisol sérico podría ser distinta durante la lactancia sino también la permeabilidad de la glándula mamaria [22].

Respecto a lo que ocurre ya durante la lactancia, Patacchioli et al. (1992) analizaron la relación entre la concentración de cortisol en suero y leche de mujeres entre de los días 1 al 5 post-parto, siendo un total de 78 pares de muestras provenientes de 15 mujeres [23]. La relación lineal entre la concentración de cortisol en suero y leche fue estadísticamente significativa ($P<0.001$) con una coeficiente de correlación de $r= 0.5404$. Sin embargo, a pesar del hallazgo realizado, esto no necesariamente refleja la transferencia de glucocorticoides y la relación que hay entre el cortisol del suero y de la leche en etapas posteriores de la lactancia ya que, además de que la concentración de cortisol en suero continua disminuyendo, durante la transición de calostro a leche madura ocurren cambios en la permeabilidad y funcionamiento de la glándula mamaria que podrían afectar la transferencia de cortisol.

Aunque no hay más estudios respecto a la relación que guarda el cortisol en suero con el de la leche, existen otros sobre cortisol y lactancia que proveen evidencia sobre la influencia que ejerce la madre sobre el hijo y/o sugieren el papel que posee el cortisol en la leche en la salud del niño. Benjamin Neelon et al. (2015) analizaron la relación que había entre el cortisol materno y el del niño de acuerdo al tipo de lactancia. En este estudio se examinaron las asociaciones entre la concentración de cortisol en saliva del niño y de la madre tres veces al día: al despertar, treinta minutos después y a la hora de dormir. Además, se evaluó si la relación difería según el tipo de lactancia: exclusiva, parcial o sólo fórmula. Se encontró que la concentración de cortisol entre los niños amamantados era mayor en los tres puntos en comparación con los niños alimentados con fórmula. También se encontró que la concentración de cortisol materno y la concentración de cortisol del niño alimentado con leche materna tenían una correlación significativa a la hora de dormir, mientras que las diadas madre-hijo alimentadas con fórmula no. Los autores señalan que son diversos los factores que podrían contribuir a la sincronía en la concentración de cortisol observada entre madres e hijos, incluyendo la interacción física, el contacto piel con piel, el ambiente compartido y, por supuesto, la transferencia de cortisol a la leche humana [24].

Glynn et al. (2007) propusieron que si la exposición a glucocorticoides a través de la leche materna influye en el temperamento, entonces esperaban encontrar una relación entre el cortisol materno y el temperamento nervioso en niños amamantados. Para determinar esta asociación se cuantificó la concentración de cortisol materno y el temperamento –utilizando el cuestionario IBQ- en niños amamantados y alimentados con fórmula a los dos meses de edad (n=253). Las concentraciones elevadas de cortisol materno se asociaron con un comportamiento temeroso en los niños amamantados (parcial $r=0.2$; $P<0.01$), mientras que en los niños alimentados con fórmula no [25].

2.4 DESARROLLO Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA

2.4.1 Uniones estrechas en la glándula mamaria

En el humano, la leche puede clasificarse en tres tipos: calostro –que se produce hasta el 4° día postparto-, leche de transición y leche madura –producida a partir del 15° día postparto-, los cuáles difieren en composición no sólo de macronutrientes, sino también de micronutrientes y factores bioactivos [8]. Esta transición de calostro a leche madura y la activación secretora están dadas por cambios que ocurren en la permeabilidad de la glándula mamaria [8, 26].

En la glándula mamaria las uniones estrechas (UE) que se encuentran entre las células epiteliales secretoras adyacentes se forman durante la lactogénesis y son fundamentales en el establecimiento y mantenimiento de la síntesis y secreción de leche [27]. Las UE en la glándula mamaria constituyen una barrera de permeabilidad que previene el transporte paracelular de iones y moléculas del suero a los compartimentos de la leche [26, 27] (**Ilustración 1**). La formación de las UE intactas al inicio de la lactancia es importante para su adecuado establecimiento. A la inversa, la pérdida de la integridad de las UE ha sido asociada a una secreción de leche y función mamaria reducida y a un aumento en el transporte paracelular de componentes séricos hacia la leche y viceversa [27].

2.4.2 Papel de las hormonas en la activación secretora y la secreción de leche

El crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria está regulado por una interacción entre hormonas esteroides, hormonas peptídicas, entre otros factores [4]. La mayor parte del crecimiento y desarrollo se da en la etapa postnatal, alcanzando éstos su punto máximo durante el embarazo y la lactancia temprana [4]. Con el inicio del embarazo, el ambiente hormonal produce un aumento en la brotación ductular, ramificación y formación lobular. En la **Ilustración 2** se puede observar de manera general qué hormonas intervienen en cada una de las fases del ciclo de lactancia y el tipo de acción que ejercen, incluyendo la intervención de los glucocorticoides [28].

Fase de desarrollo	Proliferación alveolar	Lactogénesis I	Lactogénesis II	Lactancia	Involución
Estímulo	Embarazo		Parto	Remoción de leche	No remoción de leche
<i>Hormonas reproductivas</i>					
Estrógenos				¿Inhibitoria?	
Progesterona			Disminución		
Prolactina				Algunas especies	
Oxitocina					
<i>Hormonas metabólicas</i>					
Hormona del crecimiento					
Glucocorticoides	Desconocida				
Insulina					

Hormona con acción directa en la glándula mamaria
 Hormona con acción indirecta en las fases mamarias mediante la coordinación del metabolismo

Ilustración 2. Acción hormonal necesaria para las fases del ciclo de lactancia. (Traducido de Czank C, Henderson JJ, Kent JC, et al: Hormonal control of lactation cycle. En Hale TW, Hartmann PE, editores: Textbook of human lactation, Amarillo, Tex., 2007, Hale Publishing LP, p 91)[28].

Cabe mencionar que aunque la caída en la concentración de progesterona es el principal estímulo fisiológico que desencadena la lactogénesis II, la presencia de prolactina y cortisol a ciertas concentraciones es necesaria para que este estímulo sea efectivo [29].

2.4.3 Función de los glucocorticoides en la glándula mamaria

Durante el embarazo humano la concentración basal tanto de cortisol libre como de cortisol unido a proteínas aumenta dos o tres veces. Durante las últimas semanas del embarazo, el eje HHS incrementa de forma progresiva la producción de cortisol alcanzando niveles máximos en el parto. La concentración plasmática de cortisol regresa a la concentración antes del parto después del nacimiento y continúa descendiendo durante la lactancia [4]. Además, se ha visto en otras especies que la expresión del receptor de glucocorticoides (GR) en la glándula mamaria cambia de acuerdo al estado reproductivo [30-32]; en ratas, la cantidad de GR aumenta con el embarazo y se mantiene constante hasta el embarazo tardío, alcanzando su nivel máximo en el parto; durante la lactancia la cantidad de GR disminuye y regresa a la concentración preparto [31].

Los cambios en la excreción de glucocorticoides y en la expresión del GR durante la etapa perinatal sugieren que tanto la hormona como su receptor poseen un rol

indispensable en los cambios que ocurren en la glándula mamaria durante esta etapa, incluyendo la estimulación de la activación secretora y la síntesis de la leche.

Dentro de las funciones específicas que tienen los glucocorticoides en la glándula mamaria se encuentran [4]:

- Inducir el desarrollo y formación de los componentes ultraestructurales necesarios para sostener la síntesis y secreción copiosa de leche, en particular, el retículo endoplásmico rugoso y las **UE**.
- Mantenimiento de la diferenciación de las células secretoras y de la lactancia.

2.4.4 Glucocorticoides y su función reguladora en la formación de las uniones estrechas durante la transición de calostro a leche madura

Como se mencionó anteriormente, el cortisol posee un papel importante en la formación y desarrollo de las estructuras necesarias para la producción de leche entre las cuáles se encuentra el cierre de las UE entre las células epiteliales secretoras de la glándula mamaria. Esto produce un cambio en la permeabilidad de la glándula, modifica la tasa de transferencia de componentes del suero a la leche, el funcionamiento de las células secretoras y la producción de leche, todo lo cual permite la transición de la producción de calostro a leche madura.

Diversos hallazgos realizados en animales proveen evidencia del papel que tienen los glucocorticoides sobre la formación de las UE. Brandon, Husband & Lascelles (1975) llevaron a cabo un estudio donde se les administró dexametasona- un glucocorticoide sintético- a vacas que se encontraban en gestación tardía, lo que ocasionó que se produjeran secreciones similares a la leche madura antes del parto, además de inhibir la producción de calostro postparto. Estos efectos sugieren que la dexametasona podría estimular el cierre prematuro de las UE [33].

Stelwagen et al. (1998) examinaron si el cortisol podría prevenir la permeabilidad de las UE de la glándula mamaria en vacas lactantes. Después de la acumulación de leche por 17 horas, la permeabilidad de las UE aumentaba ya que ocurría un

aumento de lactosa y α -lactoalbúmina en plasma y disminuía la tasa de secreción de leche. Encontraron que el tratamiento con ACTH prevenía el aumento en la lactosa en plasma, lo cual indicaba que la concentración elevada de cortisol redujo la “fuga” de las UE de la glándula mamaria [34].

En estudios realizados en ratones se encontró que el descenso en la concentración de progesterona era el estímulo necesario para desencadenar el cierre de las UE; pero para que el descenso de progesterona funcionara como tal, era necesaria la presencia de concentraciones bajas a moderadas de corticosterona –principal glucocorticoide en roedores- y de, ya sea prolactina o lactógeno placentario [35]. Estos hallazgos confirman lo que desde tiempo atrás se sabía, que los glucocorticoides son necesarios para la lactogénesis y la secreción de leche [29].

En resumen, el cortisol posee una función en el cierre de las UE y la disminución de la permeabilidad de la glándula mamaria, lo cual se ve reflejado en los cambios en la producción de calostro a leche de transición y a leche madura. Dado que las UE son una barrera para el transporte paracelular, durante su formación la transferencia de moléculas provenientes del suero a la leche es cada vez más restringida, es decir, que la transferencia de cortisol del suero a la leche podría verse afectada dependiendo de la etapa de lactancia.

2.6 METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL CORTISOL EN LECHE MATERNA

Como se mencionó previamente, son pocos los estudios que han cuantificado cortisol en leche humana; los métodos utilizados para la cuantificación de la hormona, las características de la población y la etapa de la lactancia son muy variados (**Tabla 1**). Para la cuantificación de cortisol se han utilizado diferentes métodos cromatográficos –como cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)- e inmunoensayos como radioinmunoanálisis, quimioluminiscencia y fluorimetría. Sin embargo, no existe uno que se considere como el ideal para uso en leche

humana. Tampoco existe una referencia sobre cuál es el rango adecuado de la concentración de cortisol en leche. Por lo tanto, es necesario continuar realizando estudios para conocer las ventajas y desventajas que ofrecen los diferentes métodos y estandarizar la metodología para cuantificación de cortisol en leche [10].

Tabla 1. Métodos utilizados y concentraciones reportadas de cortisol en leche humana.

REFERENCIA	CARACTERÍSTICAS DE SUJETOS DE INVESTIGACIÓN	MÉTODO PARA CUANTIFICACIÓN DE CORTISOL EN LECHE	CONCENTRACIÓN CORTISOL EN LECHE (nmol/L)
Grey et al. (2013)[5]	N= 52 madres a término Muestra: 3 meses postparto.	Quimioluminiscencia (posterior a deconjugación enzimática)	Media 6.1
Xu et al. (2011)[36]	N= 8 madres a término Muestra: 0-3 días postparto.	LC-MS/MS (posterior a deconjugación enzimática)	Media ± SD 3.4 ± 1.7
Kulski & Hartman (1981)[22]	N= 11 madres a término Muestra: 1 mes antes del parto a 13 meses postparto.	Radioinmunoanálisis	Postparto: Rango 0.6-88
Hart et al. (2004)[37]	N= 4 madres a término Muestra: 1 semana postparto.	Inmunoensayo fluorométrico	Media ± SD 13.2 ± 13.0 Rango 0-38.6
Sahlberg & Axelson (1986)[38]	N= 6 madres a término Muestra= <1 mes postparto.	GS-MS (posterior a deconjugación enzimática)	Rango 0-0.4
Groer, Humenick & Hill (1994)[39]	N=34 madres pretérmino y 29 madres a término Muestra= 5 días postparto	Radioinmunoanálisis	Leche pretérmino: Media 1700 Leche término: Media 1600
Öst et al. (1985)[19]	N= 6 mujeres Muestra: 4-6 días postparto.	HPLC	Rango ≤41
Van der Voorn et al. (2015)[10]	N= 13 madres a término Muestra: 8-28 semanas postparto (2-24 meses).	LC-MS/MS	Rango 4-23
Patacchioli et al. (1992)[23]	N= 15 madres a término Muestra: 1-5 días postparto	Radioinmunoanálisis	Rango de Medias: 17.7-81.4

Muestra= día de lactancia en el que se tomó la muestra de leche. Adaptado de Van der Voorn et al. (2015)[10] y Patacchioli et al. (1992)[23].

De acuerdo a lo expuesto en los apartados anteriores se destacan los siguientes puntos:

- El cortisol es una hormona importante para el desarrollo en etapas tempranas de la vida. La leche materna, principal alimento del niño durante los primeros meses de vida, es una fuente importante de cortisol y la ingestión de éste a través de la leche puede generar un impacto en el estado de salud del niño.
- A pesar de que el cortisol se encuentra presente en la leche humana se desconocen los factores que afectan su concentración y la relación que guarda con el cortisol en suero.
- No existe un método ideal para cuantificación de cortisol en leche humana.
- La concentración sérica de cortisol materno cambia a lo largo del embarazo y lactancia y, dado que éste se transfiere a la leche, sus variaciones podrían alterar la concentración de la hormona en leche.
- Los glucocorticoides ejercen un efecto sobre la glándula mamaria alterando su permeabilidad, misma que podría modificar la transferencia de cortisol y de otras moléculas a lo largo de la lactancia.

Por lo tanto, es importante saber si hay una correlación entre la concentración de cortisol en suero materno y la concentración de cortisol en leche en diferentes etapas de la lactancia, lo cual nos ayudaría a comprender cómo influyen las condiciones maternas en la composición de la leche y el papel que tiene la leche materna en la transmisión de la señal glucocorticoide de la madre al niño.

3. JUSTIFICACIÓN

El cortisol del suero de la madre se transfiere a la leche y ésta a su vez es ingerida por el niño, lo que modifica su concentración de cortisol en suero y ejerce una respuesta en él. Sin embargo, se desconoce la relación que existe entre las concentraciones de la hormona presentes en la madre, la leche y el niño, por lo que la pregunta a responder del presente proyecto es: ¿cuál es la relación entre la

concentración de cortisol en el suero materno y la concentración de cortisol en leche humanos?

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

La concentración de cortisol en suero materno se correlacionará positivamente con la concentración de cortisol en leche de mujeres en diferentes etapas de lactancia.

4.2 OBJETIVO GENERAL

Investigar si existe correlación entre la concentración de cortisol en suero materno con la concentración de cortisol en leche de mujeres en diferentes etapas de lactancia.

4.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarizar la metodología para cuantificar la concentración de cortisol en leche humana utilizando radioinmunoanálisis e inmunoensayo quimioluminiscente.
2. Analizar la relación entre la etapa de lactancia y la concentración de cortisol en leche.
3. Comparar la concentración de cortisol en leche entre las diferentes etapas de lactancia.
4. Analizar la relación entre la concentración de cortisol en suero y la concentración de cortisol en leche con el contenido nutricional de la leche en las diferentes etapas de lactancia.

5. MÉTODOS

5.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

Se consideró que esta investigación representó riesgo mínimo para los sujetos de investigación ya que para la recolección de datos y muestras se emplearon procedimientos comunes, seleccionados para obtener los datos necesarios procurando la invasión mínima posible y fueron realizados por personal capacitado.

El tipo de estudio y los procedimientos seleccionados para la recolección de la información y de las muestras biológicas se ajustan a los principios éticos y lineamientos de la declaración de Helsinki [40].

Para la obtención y manejo de muestras biológicas: la separación, transporte y disposición final de los residuos peligrosos biológicos infecciosos se realizó conforme a lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995 [41].

5.1.1 Evaluaciones y permisos otorgados

El trabajo realizado para la elaboración de la presente tesis forma parte de un proyecto de investigación de mayor magnitud, el cual cuenta con aprobaciones por parte de los siguientes organismos:

- Aprobación por el Comité de Ética en Investigación de la Secretaría de Salud del Distrito Federal (SEDESA) –ahora Ciudad de México-. El dictamen aprobatorio fue entregado en el 2016, quedando registrado con el número 404/001/01/16. Esto nos permitió laborar con el Hospital Materno Infantil Magdalena Contreras.
- Aprobación por el Comité de Investigación y el Comité de Ética de Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) con número de referencia 2060.
- Aprobación para financiamiento de CONACYT a través de la convocatoria FOSSIS, con el registro FOSISS 273137.

5.1.2 Medidas de bioseguridad para los sujetos de estudio

Se garantizó a los sujetos de investigación suspender su participación cuando lo deseen. Se protegieron los derechos, bienestar y privacidad de los participantes. Se previó en el estudio la suspensión de la participación de los sujetos de investigación si se hubiese advertido algún riesgo para ellos.

La extracción de la muestra de leche se realizó con un extractor eléctrico de uso hospitalario que puede causar un poco de molestia al extraer leche como cuando sucede cuando el bebé succiona del pecho, pero no debe causar daño ni dolor a los pezones o a la piel, además la velocidad de extracción y la fuerza de succión fueron personalizadas; la extracción no interfiere con la producción de leche.

El material que se utilizó para la recolección de muestras fue siempre nuevo, estéril y desechable; en el caso de los componentes del extractor de leche que son reutilizables, éstos fueron esterilizados en autoclave.

5.1.3 Medidas de bioseguridad para los investigadores o personal participante

Para la recolección y procesamiento de muestras se contó con bata, guantes y mascarillas cuando se requirió.

El personal que participó en el estudio tenía la capacitación adecuada para realizar los procedimientos que le correspondían, así como para atender los aspectos de seguridad propia y de los sujetos de investigación. Como parte de los requerimientos solicitados por parte del Comité de Ética del INCMNSZ, el personal cuenta con un certificado en bioética.

Otras medidas de bioseguridad necesarias

Las instalaciones de las instituciones donde se realizó el estudio son las adecuadas para la investigación propuesta, donde el manejo de muestras biológicas se realizó de acuerdo a la NOM-087-ECOL-1995 [41].

5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

5.2.1 Criterios de inclusión

Mujeres a partir de los 18 años de edad que se encuentren en cualquier etapa de lactancia, aceptar su participación en el estudio y firmar el consentimiento informado. Practicar cualquier tipo de lactancia materna ya sea exclusiva, predominante o parcial.

5.2.2 Criterios de exclusión

Uso de glucocorticoides en el tercer trimestre de embarazo. Condiciones que causen inflamación local o sistémica. Contraindicación de la lactancia como: en la madre, infección por VIH o el virus de la leucemia humana de células T tipo I (HTLV-I); en niños: galactosemia.

5.2.3 Criterios de eliminación

Proporcionar información errónea o incompleta que interfiera con el análisis estadístico.

5.3 INSTITUCIONES DE SALUD VINCULADAS

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. El Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ proporcionó las instalaciones físicas y el equipo necesario para la realización del presente proyecto, involucrando técnicas de análisis de proteínas, grasas, esteroides, cuantificación de hormonas, etc. Cuenta con varios laboratorios destinados a la investigación básica y otros para la clínica. Asimismo el INCMNSZ cuenta con personal con certificación por parte del ININ para el trabajo con material radiactivo. El Instituto también cuenta con consultorios para la investigación clínica donde se recibieron a sujetos de investigación del proyecto.

Hospital Materno Infantil Magdalena Contreras. Brindó facilidades de acceso a las derechohabientes elegibles para el estudio, gestionó la ocupación de áreas físicas para el desarrollo del proyecto (para el reclutamiento y las etapas más tempranas de lactancia) y fungió como enlace para autorización ante el Cuerpo

Colegiado correspondiente perteneciente a la Secretaría de Salud del Distrito Federal –ahora Ciudad de México-.

5.4 DISEÑO DE LA MUESTRA

5.4.1 Estrategias para la recolección de datos

Se incluyeron mujeres mayores de 18 años en cualquier etapa de lactancia.

Se han clasificado en siete grupos de acuerdo a la etapa de lactancia:

- ≤48 horas
- 1° Semana
- Mes 1
- Mes 2-3
- Mes 4-5
- Mes 6-11
- ≥Mes 12

➤ Con cada mujer se realizaron los siguientes procedimientos:

- Obtención de la historia clínica antes y durante el embarazo, así como del parto
- Toma de muestra de sangre (6 ml) para la cuantificación de cortisol en suero.
- Toma de muestra de leche materna para la cuantificación de cortisol, así como para análisis de la composición nutrimental.
- Toma de medidas antropométricas maternas: talla, peso y composición corporal; cada medida fue tomada por duplicado.

Sangre

Para determinar la concentración de cortisol en suero se tomó una muestra de sangre de 6 ml en condiciones de ayuno. Posteriormente se centrifugó a una velocidad de 3200 rpm a 4°C por 15 minutos, se separó el suero en alícuotas y se almacenó a -70°C hasta su análisis. La cuantificación de cortisol en suero se realizó por dos métodos: inmunoensayo quimioluminiscente (IQ) y radioinmunoanálisis (RIA).

Leche humana

En la leche materna se determinó la concentración de cortisol, así como también se realizó la determinación de agua, proteína y grasa.

A pesar de que podría haber diferencias en la composición de algunos nutrimentos entre la leche que produce un seno y otro[42], en los estudios llevados a cabo por Pundir et al (2017) [12] y Kulski & Hartman (1985) [22] no se encontraron diferencias entre la concentración de cortisol del seno derecho y del izquierdo. Para corroborar esta información, se tomaron muestras de ambos senos en tres de los sujetos de investigación y éstas fueron cuantificadas por radioinmunoanálisis; la variación entre el seno derecho y el izquierdo fue del 0.7%.

Por otra parte, la extracción de ambos senos se dificulta ya que las participantes tienen una menor disposición para no ofrecer leche a su hijo de ningún seno por el tiempo requerido para realizar la extracción de la muestra apropiadamente, especialmente durante los primeros días de lactancia cuando la cantidad de leche es menor y existe una mayor preocupación respecto a la alimentación de sus hijos. Es por ello que, dado que no hay variación en la concentración de cortisol en leche entre senos y existe una menor disposición para tomar la muestra de ambos, no se consideró necesario para el estudio extraer la leche de ambos senos.

Con el fin de estandarizar la muestra de leche materna y reducir la posible variación en la composición y en la concentración de cortisol por el ciclo circadiano, las muestras se recolectaron en un horario entre 7:00 y 10:00am. Se les solicitó a las madres que no ofrecieran leche de un seno por aproximadamente 1.5 horas (considerando ésta como la última toma) con el fin de recolectar el contenido total de leche producida por ese seno; esto es importante ya que la composición de leche varía a lo largo de la toma, siendo que la leche que sale al final de la toma contiene una mayor cantidad de grasa que la leche del inicio de la toma. La extracción se realizó con la ayuda un extractor eléctrico de uso hospitalario de Medela® cuya velocidad de extracción es ajustable; además, el tamaño de copa se eligen de acuerdo al tamaño del seno y del pezón [43].

La leche extraída se homogeneizó con un agitador tipo vórtex y se colocó en alícuotas que se almacenaron a -70°C hasta su análisis; cuando fue necesario, las alícuotas se colocaron en hielo para su traslado [43, 44]. Se extrajo el contenido total de leche del seno pero sólo se tomaron 15 ml para realizar los análisis y el resto de la leche se devolvió a la madre.

Cabe destacar que la cantidad total de leche que se extrae del seno –aún si no se les devolviera el sobrante- es una cantidad que no afecta la alimentación del niño en ese día ni representa ningún riesgo para la producción de la leche. El seno materno produce de nuevo leche, ya que éstos se llenan continuamente.

El análisis de la composición nutricional de la leche se realizó por medio de los siguientes métodos: proteína por el método de Bradford [45], grasa por el método de Folch [46] y agua por gravimetría.

La determinación de la concentración de cortisol se realizó por dos métodos: inmunoensayo quimioluminiscente (IQ) y radioinmunoanálisis (RIA). Los métodos utilizados tanto para el análisis de la composición nutricional como del cortisol en la leche se describirán más adelante.

5.4.2 Estandarización de la extracción de leche e identificación del vaciamiento del seno.

Cuando se realizan análisis de la composición de leche humana, en la literatura se menciona la importancia de vaciar el seno completamente [43, 44]; sin embargo, no se describe con precisión cómo identificar o asegurar que el seno ya había sido vaciado. Uno de los aportes del presente proyecto fue estandarizar la extracción de leche e identificar con precisión cuándo el seno ya había sido vaciado en su totalidad, lo cual se describe a continuación:

- Realizar la limpieza del seno con agua destilada y gasa esterilizada.
- Utilizar la copa –que forma parte del equipo de extracción- de acuerdo al tamaño del seno; es importante considerar que con la estimulación el pezón se agranda. La mayoría de las mujeres utilizan una copa mediana (24 mm de diámetro). Utilizar una copa más grande de lo necesario puede disminuir

la eficiencia de la extracción; mujeres con senos y pezones pequeños a quienes se les dificultaban realizar extracciones en su domicilio, lograron extracciones exitosas en el protocolo al elegir un tamaño de copa adecuado para ellas (21 mm de diámetro).

- La leche comienza a salir lentamente y va aumentando el flujo hasta alcanzar una velocidad de eyección más o menos constante.
- Cuando el flujo comienza a disminuir, se le pide a la mujer realizarse masaje con las yemas de los dedos con dirección hacia el pezón y colaborar con expresión manual del seno por un par de minutos. Esto ayuda a hacer más eficiente la extracción, disminuyendo el tiempo de extracción y ayudando a la leche remanente a salir, asegurándonos así de extraer la mayor cantidad de leche posible.
- Cuando el flujo disminuye considerablemente y llega a ser nulo o prácticamente nulo es importante esperar y no terminar la extracción de inmediato ya que la mayoría de las ocasiones vuelve a aumentar la velocidad de eyección una segunda vez –aunque por un tiempo más corto-. Se debe esperar mínimo 1 minuto después de la última gota antes de terminar la extracción, si no aumenta nuevamente el flujo se puede finalizar la estimulación.
- Ocasionalmente el flujo de la leche puede ser muy bajo o prácticamente nulo y extenderse por un tiempo muy prolongado –puede observarse la secreción de gotas muy separadas una de otra-. Una vez identificado esto se puede finalizar la extracción. Esto puede ocurrir porque en el seno siempre hay un volumen de leche residual.

Formatos para la recolección de datos

Aunque no toda la información recabada para el desarrollo del proyecto se presenta en este trabajo, a continuación se enlistan los formatos elaborados para la recolección de la información tanto de los sujetos de investigación como de la toma de muestras biológicas (**ver Anexos**):

- Carta de consentimiento informado

- Historia clínica
- Formato para la toma de medidas antropométricas de la madre y recolección de información antropométrica del niño.
- Formato para la toma de la muestra sanguínea de la madre
- Formato para la toma de muestra de leche

5.4.3 Análisis de muestras biológicas

Manejo de las muestras de leche

Dado que las muestras de leche se conservaron a -70°C , preferentemente se deben descongelar de forma paulatina con el objetivo de evitar un choque de temperatura. La leche debe alcanzar la temperatura ambiente ya que a bajas temperatura la grasa se pega al plástico o pueden formarse grumos de grasa.

La leche se estratifica rápidamente, en especial las muestras con mayor cantidad de grasa, por lo cual es importante homogenizar bien la muestra con un agitador tipo vórtex justo antes de utilizarla.

5.4.3.1 Cuantificación de cortisol en leche

Como se ha mencionado previamente, aunque existen estudios en la literatura donde se cuantifica la concentración de cortisol en leche humana, estos utilizan distintas metodologías y las poblaciones de estudio son muy variadas [10, 23]. Por lo tanto, parte del trabajo del presente proyecto fue la estandarización de la metodología para la cuantificación de cortisol en leche.

5.3.3.1.A Inmunoensayo quimioluminiscente (IQ)

Se utilizó el estuche comercial IMMULITE/IMMULITE 1000 Cortisol-LKC01 (E.U.A) de Siemens para la determinación cuantitativa de cortisol total en suero y leche humanos.

Éste es un inmunoensayo enzimático competitivo de fase sólida que utiliza tecnología de quimioluminiscencia. La fase sólida (microesfera) está recubierta con anticuerpo policlonal de conejo anti-cortisol. La fase líquida contiene fosfatasa alcalina (intestino bovino de ternera) conjugada con cortisol.

El equipo IMMULITE 1000 realiza el siguiente procedimiento de forma automática:

1. La muestra y el reactivo se incuban junto con la microesfera recubierta durante 30 minutos. Durante este tiempo, el cortisol presente en la muestra compite con el cortisol conjugado con la enzima del reactivo por un número limitado de sitios de unión de anticuerpo.
2. La muestra no unida y el conjugado con la enzima se eliminan mediante lavados de centrifugación.
3. El sustrato quimioluminiscente se añade a la unidad de reacción que contiene la microesfera y la señal se genera en proporción a la enzima unida.

Preparación de la muestra de leche para quimioluminiscencia

Para la cuantificación de cortisol por IQ se utilizó la muestra de leche de tres formas distintas:

- *Tratamiento con solvente*: se utilizó éter para la extracción del cortisol y posteriormente se elaboró una solución de cortisol con agua desionizada. Este método fue descartado en pruebas preliminares.
- *Sin tratamiento previo*: se utilizó la muestra de leche de forma directa, sólo asegurándonos de que estuviera adecuadamente homogeneizada.
- *Dilución y tratamiento térmico*: se diluyó la muestra de leche y se colocó en baño maría para desnaturalizar las proteínas y separar el cortisol de las proteínas transportadoras.

En el apartado 6.2 se describen los resultados obtenidos con estas pruebas.

5.4.3.1.B. Radioinmunoanálisis (RIA)

Se utilizó el estuche comercial CORT_CT2 de Cisbio Bioassays® (Francia, Modelo 24, 2017) para la determinación cuantitativa de cortisol total en suero y leche humanos.

El principio de este ensayo está basado en la competencia entre el cortisol marcado y el cortisol contenido en los calibradores o las muestras a analizar por

un número fijo y limitado de sitios de unión a anticuerpos unidos a la fase sólida (tubos recubiertos). Después de la incubación, el cortisol marcado es removido fácilmente por un paso de lavado. La cantidad de cortisol marcado unido al anticuerpo está inversamente relacionado con la cantidad de cortisol no marcado inicialmente presente en la muestra.

La muestra de leche se utilizó de forma directa, sin dilución o proceso para extracción del cortisol.

El procedimiento utilizado para la cuantificación de cortisol total fue el siguiente:

1. Dispensar 20 μ l de los calibradores reconstituidos y de las muestras a analizar en los tubos recubiertos con anticuerpos anti-cortisol.
2. Añadir 500 μ l de cortisol- I^{125} (cortisol marcado) en cada tubo (incluyendo los calibradores).
3. Mezclar los tubos suavemente con un agitador tipo vórtex.
4. Incubar por 2 horas a 37°C.
5. Decantar el líquido de cada tubo de ensayo y golpear firmemente la parte superior de los mismos contra papel absorbente (excepto los tubos de la curva de calibración).
6. Lavar una vez con 1 mL de agua destilada, sacudiendo la gradilla de tubos a mano.
7. Vaciar los tubos y golpear firmemente contra papel absorbente. Dejar los tubos parados al revés por al menos 5 minutos (excepto los tubos de la curva de calibración).
8. Medir la radiactividad remanente unida a los tubos con un contador gamma calibrado para I^{125} .

5.4.3.2 Análisis de la composición de la leche humana

La leche humana –o de cualquier otro mamífero- no posee una composición constante. Ésta puede variar por diversos motivos como son la etapa de lactancia, la hora del día, el estado de salud del bebé, etc. [42, 47, 48], y es importante

considerar esto al momento de analizarla. Básicamente puede clasificarse en tres tipos de leche de acuerdo a la etapa de lactancia [8]:

- Calostro: desde el nacimiento hasta el 4° día de lactancia.
- Leche de transición: a partir del 5° al 15° día de lactancia
- Leche madura: a partir del 15° día de lactancia.

El calostro posee una concentración de proteína de aproximadamente 2.3 g/dL [49], la cual va disminuyendo hasta alcanzar una concentración de 0.9-1.2 g/dL [8] en la leche madura. Por otra parte la concentración de grasa en el calostro es menor, siendo ésta de aproximadamente 2.9 g/dL [49] y aumentando hasta alcanzar una concentración aproximada de 3.8 a 4.2 g/dL [49, 50] en la leche madura. Cabe mencionar que la grasa es uno de los componentes más variables de la leche, ya que su concentración puede cambiar según la hora del día, si es el inicio o el final de una toma, entre otros factores [42, 47]

Adicional a la cuantificación de cortisol en leche, se realizó la determinación de proteína total, grasa y agua con los métodos que se describen a continuación.

- *Proteína*

La cuantificación de proteína se realizó por una adaptación del método de Bradford. Para este ensayo se utilizó el Reactivo de Bradford de Bio-Rad; éste análisis está basado en el cambio de color del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. La unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 365 a 595 nm. El Azul Brillante de Coomassie G-250 se presenta en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. Experimentalmente se mide la diferencia de absorbancias entre 595 y 365nm [45].

Preparación de la curva estándar

1. Diluir 1:10 la solución estándar de albúmina sérica bovina (ASB) con concentración de 10 mg/ml con agua desionizada para obtener una solución con concentración de 1 mg/ml.
2. Diluir 1:5 la solución de 1 mg/ml con agua desionizada para obtener una solución con concentración de 400 µg/ml. Se utilizaron 200 µl en la curva:
 $80 \mu\text{l ASB}[1 \text{ mg/ml}] + 120 \mu\text{l H}_2\text{O desionizada} = 200 \mu\text{l ASB}[400 \mu\text{g/ml}]$
3. Añadir por duplicado a los pozos los volúmenes correspondientes a cada dosis:

Volumen (µl)	Proteína [µg/ml]
0	0
5	2
7.5	3
10	4
12.5	5
25	10
37.5	15

4. Añadir 200 µl del reactivo de Bradford previamente diluido 1:5.
5. Dejar incubar por 10 minutos y leer absorbancia a 595 nm.

Preparación de la muestra

1. Diluir la muestra con agua desionizada de acuerdo a la etapa de lactancia:

Etapas de lactancia	Dilución
Calostro ($\leq 48\text{h}$)	1:100
1° Semana	1:50
Leche madura	1:20

2. Centrifugar las diluciones a 1400 rpm a 4°C por 10 minutos.
3. Separar la fase superior con una pipeta Pasteur.
4. Añadir por triplicado 10 µl de muestra en cada pozo.
5. Añadir 200 µl del reactivo de Bradford previamente diluido 1:5.
6. Incubar por 10 min y leer a 595 nm.

- *Grasa*

La cantidad de grasa en leche humana se determinó por una adaptación del método de Folch [46]. Cada muestra se analizó por triplicado. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

1. Dispensar 200 μ l de leche en tubos de ensayo de vidrio.
2. Añadir 5.4 ml de una mezcla de cloroformo y metanol (2:1) y 1.8 ml de cloruro de sodio al 0.7%.
3. Cubrir tubos y agitarlos.
4. Centrifugar durante 15 min a 2000 rpm a 4°C.
5. Separar cuidadosamente la fase superior con ayuda de un sistema de vacío.
6. Transferir la fase inferior a otros tubos de ensayo, los cuales fueron previamente puestos a peso constante.
7. Colocar a baño maría a 60°C para evaporar la mezcla de solventes.
8. Colocar en una campana de extracción para secar el agua remanente y se evapore lo que resta de solventes.
9. Pesar los tubos hasta que alcancen un peso constante.
10. Determinar los gramos de grasa por gravimetría.

- *Contenido de agua*

El porcentaje de agua se determinó por el método de gravimetría. Cada muestra se analizó por triplicado. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

1. Dispensar de 100 a 500 μ l de leche en charolas de papel aluminio, las cuales fueron previamente puestas a peso constante.
2. Pesar las charolas con la muestra húmeda.
3. Colocar las charolas en estufa a 60°C.
4. Pesar las charolas 24 horas después hasta que alcancen un peso constante.
5. Determinar el porcentaje de agua por gravimetría.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Se obtuvieron 160 pares de muestras de suero y leche, aunque no todos los pares pudieron ser utilizados para cuantificación de cortisol por ambos métodos debido a la cantidad de muestra obtenida. En la **Tabla 2** se describen las características generales de la población de estudio.

Tabla 2. Características generales de la población de estudio

	MEDIA±EE	N
Edad (años)	29.3±0.7	160
Peso pregestacional (Kg)	61.6±1.1	158
IMC pregestacional (Kg/m²)	24.8±0.4	157
Ganancia de peso (Kg)	12.7±0.6	157
No. De gestas	1.8±0.1	160
Edad gestacional al nacimiento	39.0±0.2	159

Así mismo, en el presente estudio se incluyeron mujeres cuyos hijos nacieron tanto por parto (53.9%) como por cesárea (46.1%) (**Tabla 3**).

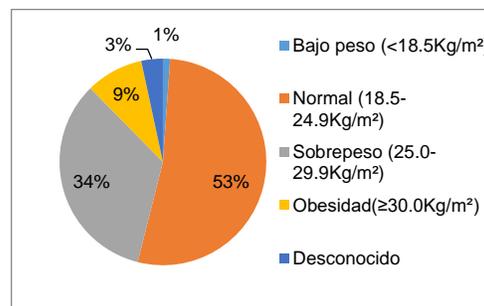
Tabla 3. Vía de nacimiento

	N	%
Parto	86	53.8
Cesárea	74	46.3

Dado que muchas de las mujeres al momento del reclutamiento –especialmente en las primeras etapas de lactancia- aún retienen líquidos y/o parte del peso que ganaron durante su embarazo, se tomó como referencia para su clasificación el Índice de Masa Corporal (IMC) pregestacional (**Tabla 4 y Gráfica 1**). Éste fue calculado con el peso pregestacional referido por las mujeres. Cabe mencionar que las mujeres que fueron clasificadas en el grupo de Obesidad, todas correspondían a Obesidad Tipo I, es decir, con un IMC entre 30.0 y 34.9 Kg/m²[51].

Tabla 4. Clasificación por Índice de Masa Corporal pregestacional

CLASIFICACIÓN	N	%
Bajo peso (<18.5Kg/m ²)	2	1.3
Normal (18.5-24.9Kg/m ²)	85	53.1
Sobrepeso (25.0-29.9Kg/m ²)	54	33.8
Obesidad(≥30.0Kg/m ²)	15	9.4
Desconocido	4	2.5
TOTAL	160	100.0

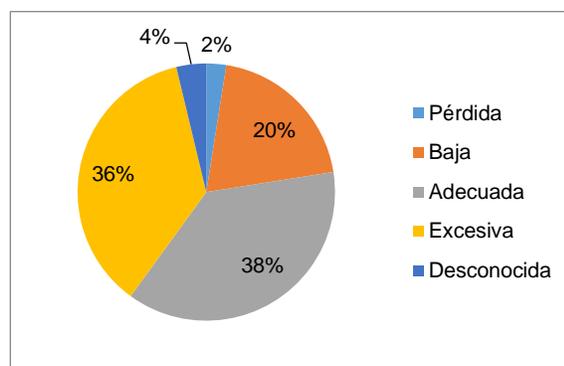


Gráfica 1. Clasificación por Índice de Masa Corporal pregestacional.

Aunque el IMC pregestacional está asociado a la salud durante el embarazo, también es importante considerar la ganancia de peso durante el mismo. El peso que se debe aumentar durante la gestación, así como la velocidad de ganancia del mismo va a depender del IMC pregestacional. Es por ello que también se clasificó a las mujeres de acuerdo a si su ganancia de peso durante el embarazo fue adecuada o inadecuada según el IMC pregestacional individual (**Tabla 5 y Gráfica 2**), de acuerdo a los parámetros del Instituto de Medicina de los Estados Unidos (IOM)[52]. Como puede observarse en la **Tabla 5** y en la **Gráfica 2**, un 37% de las mujeres tuvieron una ganancia adecuada de peso (n=33), sin embargo, la cantidad de mujeres que tuvieron una ganancia excesiva fue del 36.0% (n=32).

Tabla 5. Clasificación de la ganancia de peso durante el embarazo

Ganancia de peso	N	%
Pérdida	4	2.5
Baja	32	20.0
Adecuada	60	37.5
Excesiva	58	36.3
Desconocida	6	3.8
TOTAL	160	100.0



Gráfica 2. Clasificación de la ganancia de peso durante el embarazo.

6.2 COMPOSICIÓN DE LA LECHE

Además de cuantificar la concentración de cortisol en leche, se realizó el análisis de proteína, grasa y agua en las distintas etapas de la lactancia (**Tabla 6**). La cantidad de leche extraída de un seno es menor en las primeras 48 horas (Media \pm EE 3.4 ± 1.1 ml), aumenta durante la primera semana (Media \pm EE 38.7 ± 7.1 ml) hasta alcanzar una concentración estable a partir del Mes 1 hasta el Mes 6-11 de lactancia, es decir, no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre el Mes 1, Mes 2-3, Mes 4-5, Mes 6-11 de lactancia (Media \pm EE (ml): 68.3 ± 9.1 , 76.6 ± 9.3 , 63.9 ± 7.8 y 68.6 ± 8.2 respectivamente); posteriormente vuelve a disminuir a partir de los 12 meses (Media \pm EE 37.2 ± 7.9 ml). Aunque la cantidad de leche extraída no representa el volumen total producido al día, el aumento y disminución del volumen extraído es similar al aumento y disminución reportados del volumen total ingerido por los niños de países en desarrollo a lo largo de la lactancia [53].

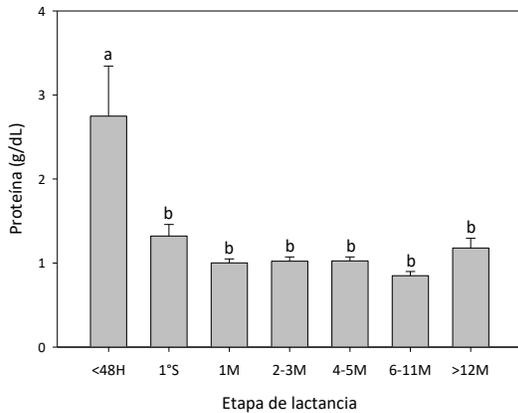
Tabla 6. Composición de leche humana en diferentes etapas de lactancia.

Componente	Etapa de lactancia						
	$\leq 48H$ (N=9)	1°S (N=27)	1M (N=22)	2-3M (N=33)	4-5M (N=27)	6-11M (N=29)	$\geq 12M$ (N=12)
Cantidad (ml)	3.4 ± 1.1^a	38.7 ± 7.1^{ab}	68.3 ± 9.1^b	76.6 ± 9.3^b	63.9 ± 7.8^b	68.6 ± 8.2^b	37.2 ± 7.9^{ab}
Proteína (g/dl)	2.8 ± 0.6^a	1.3 ± 0.1^b	1.0 ± 0.0^b	1.0 ± 0.1^b	1.0 ± 0.0^b	0.9 ± 0.0^b	1.2 ± 0.1^b
Grasa (g/dl)	1.4 ± 0.4^a	3.0 ± 0.3^{ab}	4.0 ± 0.3^b	4.0 ± 0.3^b	4.1 ± 0.3^b	3.6 ± 0.3^{ab}	5.5 ± 0.9^c
Agua (g/dl)	85.5 ± 2.0^a	87.9 ± 0.3^a	86.9 ± 0.4^a	87.4 ± 0.3^a	87.1 ± 0.3^a	87.6 ± 0.3^a	85.2 ± 1.0^a

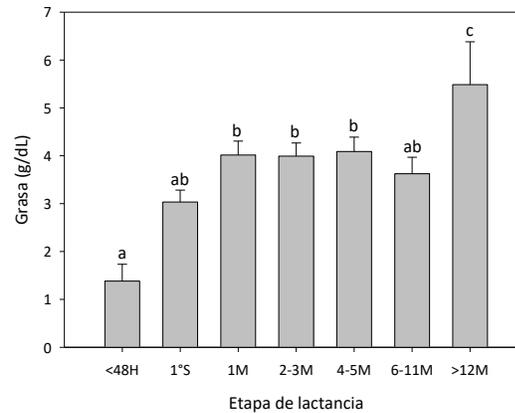
Valores como media \pm EE. Datos que no comparten al menos una letra son estadísticamente diferentes, ($p < 0.05$). "Cantidad (ml)" se refiere a la cantidad de leche extraída de un seno.

En general, los cambios observados en la composición en la leche corresponden a la variación normal esperada de los distintos nutrimentos a lo largo de la lactancia y son similares a los datos reportados por la literatura [8, 49, 50]. Se espera que conforme la leche pasa de calostro a leche madura la cantidad de proteína disminuya -de 2.3 a 0.9-1.2 g/dL aprox.- y la cantidad de grasa aumente -de 2.9 a 3.8-4.2 g/dL aprox.-. De las primeras 48 horas al primer mes la media de la concentración de proteína (**Gráfica 3**) disminuyó de 2.8 a 1.0 g/dL y mantuvo la

misma concentración hasta el mes 4-5; la cantidad de grasa (**Gráfica 4**) aumentó de 1.4 a 4.0 g/dL y se mantuvo estable hasta el mes 4-5 (4.1 g/dL).



Gráfica 3. Cantidad de proteína en leche Media \pm EE, datos que no comparten la misma letra son estadísticamente diferentes, ($p < 0.05$)



Gráfica 4. Cantidad de grasa en leche Media \pm EE, datos que no comparten al menos una letra son estadísticamente diferentes, ($p < 0.05$)

6.3 CORTISOL

6.3.1 Cortisol en suero por Inmunoensayo Quimioluminiscente (IQ) y Radioinmunoanálisis (RIA)

La concentración de cortisol en suero se determinó tanto por IQ como por RIA utilizando la muestra de forma directa. En la **Tabla 7** se muestran las concentraciones de cortisol en suero en cada etapa. No hubo diferencias significativas entre ambos métodos en ninguna de las etapas de lactancia ($P < 0.05$) excepto durante las primeras 48 horas de lactancia ($P = 0.016$). Cabe mencionar que el tamaño de muestra ($n = 4$) en esta etapa pudo haber influido en el resultado obtenido; dadas las dificultades para la recolección de muestras biológicas durante las primeras horas de lactancia fueron pocas las muestras de suero que pudieron cuantificarse por ambos métodos. Cabe señalar que en los laboratorios de análisis clínicos tanto RIA como IQ son utilizados para la cuantificación de cortisol [54].

Tabla 7. Concentración de cortisol en suero por Quimioluminiscencia y Radioinmunoanálisis.

[Cortisol (ng/μl)] en SUERO (Media ± EE)				
Etapas	N	Quimioluminiscencia	Radioinmunoanálisis	P
≤48 horas	4	362.5 ± 36.2	238.8 ± 8.6	0.016
1° Semana	19	249.2 ± 21.2	225.3 ± 22.8	0.448
Mes 1	20	151.8 ± 13.7	144.3 ± 11.7	0.680
Mes 2-3	32	139.3 ± 7.8	145.0 ± 8.7	0.628
Mes 4-5	26	115.2 ± 8.6	122.1 ± 7.5	0.551
Mes 6-11	28	132.5 ± 6.5	144.2 ± 5.4	0.174
≥ Mes 12	11	108.1±10.7	119.2 ± 11.6	0.491

Para el análisis estadístico los resultados derivados de la cuantificación de cortisol en suero por un método se analizaron junto con los resultados obtenidos por el mismo método en leche. Los valores de la concentración de cortisol tanto en suero como en leche se presentan como Media ± EE (error estándar).

6.3.2 Determinación de cortisol en leche mediante Inmunoensayo Quimioluminiscente (IQ)

Para la estandarización de la metodología para cuantificación de cortisol en leche se utilizaron dos métodos: IQ y RIA. Así también, para la determinación de cortisol en suero se utilizaron ambos métodos.

Para la cuantificación de cortisol por IQ se utilizó la muestra de leche de tres formas distintas:

1. Tratamiento con solvente (éter).
2. Dilución de la muestra y tratamiento térmico.
3. Sin tratamiento previo.

Para la primera se utilizó éter para la extracción del cortisol y posteriormente se elaboró una solución de cortisol con agua desionizada, misma que fue analizada. Para la segunda variante con las muestras diluidas se preparó una solución de leche 1:1 con agua desionizada; posteriormente se puso la solución a baño maría a 60°C por 1 hora con la finalidad de separar el cortisol de las proteínas de

transporte a las que se encuentra unida (CBG y albúmina principalmente). Para la tercera variante se utilizó la muestra de leche de forma directa, sólo asegurando que estuviera adecuadamente homogeneizada.

Se realizaron pruebas preliminares con muestras de leche humana con la primera y segunda variantes. Con la determinación de la concentración de cortisol en leche utilizando la extracción con éter los resultados obtenidos fueron concentraciones más bajas que con la dilución cuyos valores se encontraban por debajo del límite de detección del ensayo ($<1 \mu\text{g/dL}$), además, el segundo procedimiento fue mucho más sencillo; por lo tanto, el primer procedimiento fue descartado.

En la **Tabla 8** pueden observarse las concentraciones de cortisol en leche de las muestras que fueron diluidas y de las que fueron utilizadas de forma directa (no diluidas). La diferencia entre las concentraciones de cortisol de las muestras de leche diluidas y las muestras no diluidas (Media \pm EE ($\mu\text{g/dl}$): 1.9 ± 0.3 vs. 5.1 ± 0.3) fue significativa ($P < 0.001$).

Tabla 8. Concentración de cortisol en leche por Inmunoensayo Quimioluminiscente

	N	[Cortisol ($\mu\text{g/dl}$)] en LECHE (Media \pm EE)
Diluidas	90	1.9 ± 0.3
No diluidas	70	5.1 ± 0.3

6.3.3 Cortisol en suero vs cortisol en leche por Inmunoensayo Quimioluminiscente (IQ)

Se realizó un análisis de correlación de Spearman entre la concentración de cortisol en suero y la concentración de cortisol en leche con las muestras de leche diluidas ($n=90$) y las no diluidas ($n=70$) (**Tabla 9**). En ambos casos hubo una correlación positiva significativa: $r_s=0.361$ ($P=5.07 \times 10^{-4}$) y $r_s=0.375$ ($P=0.015$) respectivamente. Al realizar el mismo análisis incluyendo todos los pares de suero-leche ($n=160$) -incluyendo muestras tanto diluidas como no diluidas- no hubo correlación ($r_s = 0.0771$, $P=0.342$).

Tabla 9. Concentración de cortisol en suero y leche de acuerdo a las variantes del Inmunoensayo Quimioluminiscente

	N	[Cortisol (µg/dl)] en SUERO (Media ± EE)	[Cortisol (µg/dl)] en LECHE (Media ± EE)	r _s	P
Diluidas	90	17.6 ± 0.9	1.9 ± 0.3	0.361	5.07x10 ⁻⁴
No diluidas	70	13.1 ± 0.7	5.1 ± 0.3	0.375	0.015
Diluidas + No diluidas	160	15.8 ± 0.6	3.4 ± 0.2	0.0771	0.342

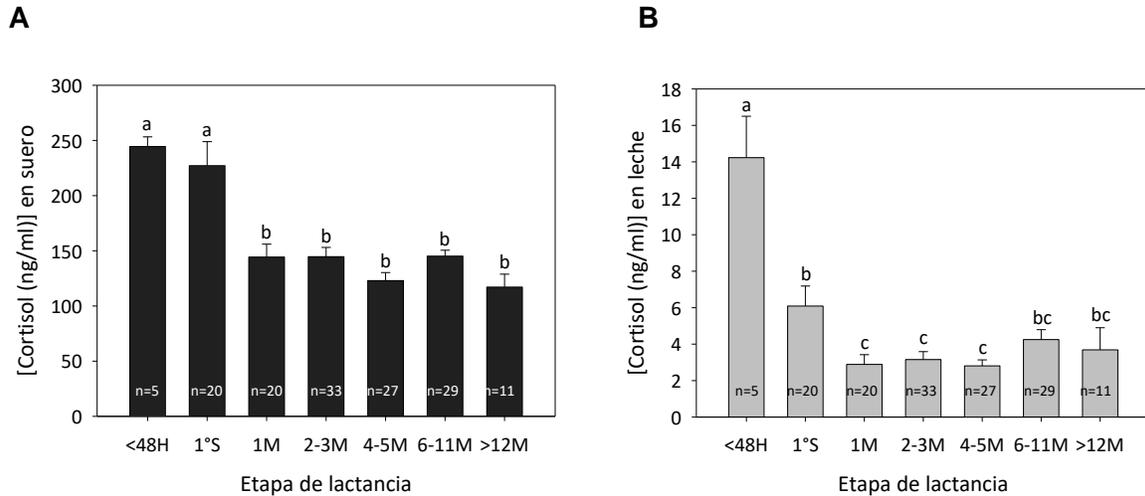
6.3.4 Concentración de cortisol por Radioinmunoanálisis (RIA)

Todas las muestras analizadas por RIA se corrieron en un mismo ensayo. En el suero el coeficiente de variación intraensayo fue del 12.0%, mientras que en la leche fue del 22.7%.

Para el análisis detallado de la concentración de cortisol en suero, la concentración de cortisol en leche y la relación que hay entre ambas sólo se usó RIA, ya que en la cuantificación de cortisol en leche éste método es capaz de detectar bajas concentraciones de cortisol, los resultados tienen una mayor similitud con lo reportado en la literatura en comparación con IQ, además de que hubo una gran variación en los resultados al cuantificar cortisol en leche por IQ. Estos puntos se discutirán a detalle más adelante.

La concentración de cortisol en suero es significativamente mayor durante las primeras 48 horas y la primera semana de lactancia (Media ± EE: 244.5 ± 8.8 y 227.1 ± 21.7 ng/µl respectivamente); posteriormente la concentración disminuye hacia el Mes 1 (Media ± EE: 144.3±11.7ng/µl) y se mantiene estable a lo largo de las etapas de lactancia restantes (**Gráfica 5A**), es decir, no hay diferencias significativas entre ninguna de las etapas del Mes 1 en adelante (P>0.05). En la **Gráfica 5B** puede observarse que la concentración de cortisol en leche es significativamente mayor en las primeras 48 horas de lactancia, disminuye durante la primera semana y lo hace aún más a partir del primer mes de lactancia (Media ± EE: 14.2 ± 2.3, 6.1 ± 1.1 y 2.9 ± 0.5 ng/µl respectivamente; P<0.05), donde alcanza concentraciones estables hasta el mes 4-5, ya que no hay diferencias entre el Mes 1, Mes 2-3 y Mes 4-5 (Media±EE: 2.9±0.5, 3.2±0.4 y 2.8±0.3

respectivamente; $P>0.05$). Tanto en suero como en leche la concentración de cortisol disminuye después del parto, sin embargo, el comportamiento no es exactamente igual a lo largo de las etapas de lactancia.



Gráfica 5. Concentración de cortisol en suero y leche por Radioinmunoanálisis. Media±EE, datos que no comparten al menos una letra son estadísticamente diferentes, ($p<0.05$)

En la **Tabla 10** se presentan las medias de la concentración de cortisol en suero y leche, donde puede observarse que la concentración de cortisol en leche es significativamente menor ($P<0.001$), cantidad que representa del 2.0 al 5.8% del cortisol en suero.

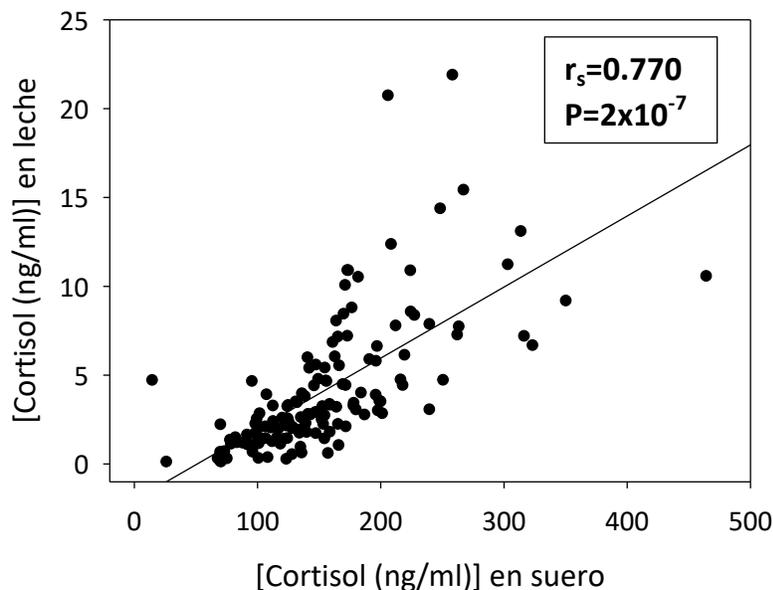
Tabla 10. Fracción de la concentración de cortisol en suero presente en la leche.

	N	[Cortisol (ng/μl)] en SUERO (Media ± EE)	[Cortisol (ng/μl)] en LECHE (Media ± EE)	Cociente de [Cortisol] en leche/[Cortisol] en suero x 100 (%)
≤48 horas	5	244.5 ± 8.8 ^a	14.2±2.3 ^a	5.8
1° Semana	20	227.1 ± 21.7 ^a	6.1±1.1 ^b	2.7
Mes 1	20	144.3 ± 11.7 ^b	2.9±0.5 ^c	2.0
Mes 2-3	33	144.6 ± 8.4 ^b	3.2±0.4 ^c	2.2
Mes 4-5	27	123.0 ± 7.3 ^b	2.8±0.3 ^c	2.3
Mes 6-11	29	145.2 ± 5.3 ^b	4.3±0.5 ^{bc}	2.9
≥ Mes 12	11	117.1 ± 11.7 ^b	3.7±1.2 ^{bc}	3.2

Datos correspondientes al mismo tipo de muestra –suero o leche- que no comparten al menos una letra son estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

6.3.5 Relación entre la concentración de cortisol en suero y la concentración de cortisol en leche.

Para determinar si hay correlación entre la concentración de cortisol en suero y la concentración de cortisol en leche se utilizaron los resultados derivados del RIA. Se realizó un análisis de correlación Spearman -ya que los resultados obtenidos en leche no poseen una distribución normal- que abarcó todas las etapas de lactancia (**Gráfica 6**). La correlación entre ambas concentraciones fue positiva con un coeficiente de correlación de $r_s=0.770$ y un valor de P de 2×10^{-7} , lo cual quiere decir que entre mayor es la concentración de cortisol en suero mayor es la concentración de cortisol en leche.



Gráfica 6. Concentración de cortisol en suero vs concentración de cortisol en leche.

Como se mencionó anteriormente, el análisis de correlación abarca todas las etapas de lactancia del estudio. Sin embargo, como se puede observar en las **Gráficas 5A y 5B** el comportamiento de la concentración de cortisol en suero y en leche aunque es similar, no es exactamente igual a lo largo de las etapas de lactancia. Sumado a ello, se sabe que la composición de la leche y la permeabilidad a lo largo de la lactancia no siempre es la misma.

Por lo tanto, se realizó un análisis de regresión lineal y posteriormente un análisis de covarianza utilizando tres variables –cortisol en suero, cortisol en leche y etapa de lactancia-, considerando que no sólo la concentración de cortisol en suero podría afectar la concentración de cortisol en leche, sino también la etapa de lactancia. Cabe mencionar que para el análisis se utilizó el logaritmo para la normalización de los datos de la concentración de cortisol en leche.

Los resultados arrojaron que la concentración de cortisol en suero sí afecta la concentración de cortisol en leche ($F_{1,131}= 165.3505$, $P=2.2 \times 10^{-16}$), que la etapa de lactancia también ($F_{6,131}= 4.0464$, $P=0.0009$), así como la interacción entre la concentración de cortisol en suero y la etapa de lactancia ($F_{6,131}= 5.2590$, $P=6.954 \times 10^{-5}$).

Así mismo, se realizó de forma individual el análisis de correlación de la concentración de cortisol en suero y la concentración de cortisol en leche para cada una de las etapas de lactancia. En la **Tabla 11** se muestra el coeficiente de correlación de Spearman (r_s) y el valor de P para evaluar la significancia estadística. En todas las etapas de lactancia hay una correlación positiva significativa ($P < 0.05$) entre la concentración de cortisol en suero y la concentración de cortisol en leche con un r_s mayor a 0.65 en todos los casos.

Tabla 11. Correlación entre la concentración de cortisol en suero y la concentración de cortisol en leche en cada etapa de lactancia.

	N	[Cortisol (ng/μl)] en SUERO (Media ± EE)	[Cortisol (ng/μl)] en LECHE (Media ± EE)	r_s	P
≤48 horas	5	244.5 ± 8.8	14.2±2.3	0.800	1.33×10^{-2}
1° Semana	20	227.1 ± 21.7	6.1±1.1	0.702	4.36×10^{-4}
Mes 1	20	144.3 ± 11.7	2.9±0.5	0.839	2×10^{-7}
Mes 2-3	33	144.6 ± 8.4	3.2±0.4	0.814	2×10^{-7}
Mes 4-5	27	123.0 ± 7.3	2.8±0.3	0.657	1.68×10^{-2}
Mes 6-11	29	145.2 ± 5.3	4.3±0.5	0.853	2×10^{-7}
≥ Mes 12	11	117.1 ± 11.7	3.7±1.2	0.810	8.76×10^{-4}

6.3.6 Relación entre el cortisol y la composición de la leche

Como se ha mencionado anteriormente, dentro de las múltiples funciones que posee el cortisol se encuentran la regulación del metabolismo energético y el desarrollo y funcionamiento de la glándula mamaria lo cual abarca la estimulación de la activación secretora y la síntesis de leche y el mantenimiento de la lactancia.

Es posible que el cortisol tenga un impacto en la composición de la leche produciendo un aumento de los nutrimentos que proveen calorías a la leche como la proteína y la grasa. En el estudio de Hinde et al. (2015) realizado en macacos rhesus se encontró que la concentración de cortisol en leche –en muestras del primer mes de lactancia y de la lactancia pico (entre el 3° y 4° mes)- está asociada positivamente con la cantidad de grasa y de proteína en la leche.

Por lo tanto, en el presente estudio se realizaron correlaciones de Spearman tanto de la concentración de cortisol en suero como de la concentración de cortisol en leche con la grasa y la proteína de la leche de las diferentes etapas estudiadas, realizadas tanto individualmente como en conjunto.

En la **Tabla 12** se encuentra el análisis de correlación entre la concentración de cortisol en suero y la cantidad de proteína de la leche de las diferentes etapas estudiadas y en ninguno de los casos hubo correlación ($P > 0.05$).

Tabla 12. Correlación entre la concentración de cortisol en suero y la cantidad de proteína de la leche.

Etapa	N	[Cortisol (ng/μl)] en SUERO (Media ± EE)	Proteína (g/dl)	r_s	P
≤48 horas	5	244.5±8.8	2.7±0.9	0.600	>0.05
1° Semana	19	225.3±22.8	1.4±0.2	0.379	>0.05
Mes 1	20	144.3±11.7	1.0±0.0	-0.127	>0.05
Mes 2-3	32	144.9±8.7	1.0±0.0	0.110	>0.05
Mes 4-5	27	123.0±7.3	1.0±0.0	-0.257	>0.05
Mes 6-11	29	145.2±5.3	0.9±0.0	0.131	>0.05
≥ Mes 12	11	119.2±11.6	1.2±0.1	-0.064	>0.05
TODAS LAS ETAPAS	143	152.9±5.3	1.1±0.0	0.149	>0.05

En la **Tabla 13** se encuentra el análisis de correlación entre la concentración de cortisol en leche y la cantidad de proteína de la leche de las diferentes etapas. Sólo en el caso del Mes 4-5 de lactancia hubo una correlación negativa ($r_s=-0.561$, $P<0.01$) –contrario a lo encontrado en el estudio de Hinde et al-. Sin embargo, este dato debe confirmarse con el incremento del número de muestra.

Tabla 13. Correlación entre la concentración de cortisol en leche y la cantidad de proteína de la leche.

Etapa	N	[Cortisol (ng/μl)] en LECHE (Media ± EE)	Proteína (g/dl)	r_s	P
≤48 horas	5	14.2±2.3	2.7±0.9	0.600	>0.05
1° Semana	19	6.0±1.2	1.4±0.2	0.126	>0.05
Mes 1	20	2.9±0.5	1.0±0.0	0.155	>0.05
Mes 2-3	32	3.2±0.4	1.0±0.0	0.175	>0.05
Mes 4-5	27	2.8±0.3	1.0±0.0	-0.561	<0.01
Mes 6-11	29	4.3±0.5	0.9±0.0	0.045	>0.05
≥ Mes 12	11	3.7±1.2	1.2±0.1	0.236	>0.05
TODAS LAS ETAPAS	143	4.1±0.3	1.1±0.0	0.0638	>0.05

En el caso de la grasa, en la **Tabla 14** se encuentra el análisis de correlación entre la concentración de cortisol en suero y la cantidad de grasa de la leche de las diferentes etapas. Hubo correlación negativa ($r_s=-0.245$, $P<0.01$) al realizar el análisis en conjunto de todas ellas. Sin embargo, no se observa lo mismo al analizar las etapas de forma individual.

Tabla 14. Correlación entre la concentración de cortisol en suero y la cantidad de grasa de la leche.

Etapa	N	[Cortisol (ng/μl)] en SUERO (Media ± EE)	Grasa (g/dl)	r_s	P
≤48 horas	5	244.5±8.8	1.6±0.4	-0.103	>0.05
1° Semana	19	225.3±22.8	3.2±1.3	-0.377	>0.05
Mes 1	20	144.3±11.7	4.1±0.3	-0.228	>0.05
Mes 2-3	32	144.9±8.7	4.1±0.3	-0.0576	>0.05
Mes 4-5	27	123.0±7.3	4.1±0.3	0.0673	>0.05
Mes 6-11	28	145.5±5.5	3.6±0.3	-0.125	>0.05
≥ Mes 12	11	119.2±11.6	5.3±1.0	0.290	>0.05
TODAS LAS ETAPAS	142	153.1±5.3	3.9±1.8	-0.245	<0.01

En la **Tabla 15** se encuentra el análisis de correlación entre la concentración de cortisol en leche y la cantidad de grasa de la leche de las etapas estudiadas. En la Primera Semana de lactancia hubo correlación negativa ($r_s=-0.538$, $P<0.05$) así como en el análisis en conjunto de todas las etapas ($r_s=-0.230$, $P<0.01$).

Tabla 15. Correlación entre la concentración de cortisol en leche y la cantidad de grasa de la leche.

Etapas	N	[Cortisol (ng/μl)] en LECHE (Media ± EE)	Grasa (g/dl)	r_s	P
≤48 horas	5	14.2±2.3	1.6±0.4	-0.205	>0.05
1° Semana	19	6.0±1.2	3.2±1.3	-0.538	<0.05
Mes 1	20	2.9±0.5	4.1±0.3	-0.375	>0.05
Mes 2-3	32	3.2±0.4	4.1±0.3	-0.020	>0.05
Mes 4-5	27	2.8±0.3	4.1±0.3	0.088	>0.05
Mes 6-11	28	4.3±0.6	3.6±0.3	-0.017	>0.05
≥ Mes 12	11	3.7±1.2	5.3±1.0	0.299	>0.05
TODAS LAS ETAPAS	142	4.1±0.3	3.9±1.8	-0.230	<0.01

7. DISCUSIÓN

Es importante esclarecer qué es lo que sucede con el cortisol en cada uno de los puntos del trayecto desde que es secretado en la madre hasta que ejerce un efecto en el hijo, lo que incluye la transferencia a través de la leche materna. Aunque diversas condiciones maternas puedan afectar la composición de la leche o la concentración de cortisol en la misma, el conocer la concentración en suero de cortisol es una referencia de suma importancia ya que, aunque tuviéramos una descripción extensa de las características maternas o el control de la población de estudio fuera muy estricto, no sabríamos cómo afectarían estas características a la concentración de cortisol en suero que es de donde proviene el cortisol en la leche.

Para la cuantificación de cortisol en suero en la práctica clínica tanto RIA como IQ son apropiados. Se cuantificó la concentración de cortisol del suero materno por ambos métodos con la finalidad de poder realizar los análisis correspondientes con la concentración de cortisol en leche cuantificada mediante el método

homólogo. Los resultados obtenidos por RIA y los obtenidos por IQ en suero son similares en todas las etapas de lactancia. Sin embargo, en el caso de la leche no ocurrió lo mismo.

El trabajo realizado para la elaboración de la presente tesis involucró la estandarización de la metodología para la cuantificación de cortisol en leche humana ya que aún se desconoce cuál es el método ideal para hacerlo y cuáles son las ventajas y desventajas que tiene el uso de cada uno de ellos. Aunque se utilizó tanto RIA como IQ, se eligió el primer método y los resultados arrojados por éste fueron los utilizados para el análisis de la relación entre el cortisol en suero materno y el cortisol en leche; los motivos de esta elección se exponen a continuación.

Los resultados de la concentración de cortisol en leche cuantificada por RIA (Media: 11.3 nmol/L; Rango: 0.33-60.4 nmol/L) tienen una mayor similitud a las concentraciones reportadas en otros estudios donde se utilizan diferentes métodos para cuantificación de la hormona [10, 23] (**Tabla 1**), mientras que la concentración de cortisol cuantificada por IQ se aleja de ellas y es mayor (Media: 94.14 nmol/L; Rango: 0.03-333.8 nmol/L). En comparación con el estudio llevado a cabo por Grey et al. (2013) donde utilizaron IQ con deconjugación enzimática, la media de la concentración de cortisol obtenida por IQ del presente proyecto es 15 veces mayor (6.1 vs 94.1 nmol/L) [5]. Respecto al RIA, el rango de la concentración de cortisol reportada por Kulski & Hartman (1981) es similar a nuestros resultados obtenidos con el mismo método (0.6-88 vs 0.33-60.4 nmol/L) [22]. Groer, Humenick & Hill (1994) también cuantificaron mediante RIA [39], sin embargo, en comparación con otros estudios que utilizaron inmunoensayos [10, 23] y con nuestros resultados las concentraciones extremadamente altas de cortisol en leche no pueden explicarse (Medias de 1600 y 1700 nmol/L).

También hubo una gran variación en los resultados al cuantificar cortisol en leche por IQ. Los resultados obtenidos con las muestras diluidas y sometidas a tratamiento térmico en comparación con los de las muestras sin ningún tratamiento fueron muy distintos entre sí. La concentración de cortisol fue mayor al

utilizar la muestra de forma directa versus al diluirla (Media \pm EE: 5.1 ± 0.3 vs. 1.9 ± 0.3). Además, hubo una gran variación interensayo en muestras procesadas con el mismo tratamiento.

A pesar de que al utilizar IQ los valores arrojados son mayores que con RIA, hubo numerosos valores que se encontraban por debajo del límite inferior de detección ($<1 \text{ ug/dL} = 27.59 \text{ nmol/L}$) y se calcularon utilizando las cuentas por segundo (CPS) y extrapolando la curva y otros cuyas CPS eran ya muy bajas como para calcular un resultado confiable ($<0.001 \text{ ug/dL} = 0.028 \text{ nmol/L}$). Esto quiere decir que, dados los límites de detección que posee el equipo que se utiliza en nuestro laboratorio para IQ, no es un método útil para cuantificar cortisol en leche bajo nuestras condiciones de trabajo, ya que es común que las concentraciones de cortisol en leche sean bajas.

Es posible que la IQ sea útil para la cuantificación de cortisol en leche humana, sin embargo, dada la cantidad de muestra de leche que se tenía no fue posible realizar más pruebas para encontrar la manera adecuada de hacerlo por este método de la forma más apropiada; además, el equipo y los reactivos utilizados no pueden cuantificar concentraciones menores a 1 ug/dL .

En general, las bajas concentraciones de cortisol que hay en leche podrían presentar una problemática para el análisis ya que una variación muy pequeña en unidades –considerada apropiada según el método utilizado y que para la cuantificación en suero no representa problema alguno- podría significar un porcentaje de variación inter o intraensayo mayor de lo esperado.

En resumen, para las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio el RIA se consideró un método más adecuado que la IQ para la cuantificación de cortisol en leche humana ya puede detectar cantidades muy bajas del analito, considerando que la concentración de cortisol en la leche es mucho menor en comparación con el suero. Además, el RIA es capaz de hacerlo en mezclas con grandes cantidades y diversidad de materiales extraños, como en el caso de la leche, por no lo que no es necesario purificar previamente la muestra como ocurre en el caso de la IQ. Además, los resultados obtenidos por RIA tienen una mayor similitud a lo que ya

se encuentra reportado en la literatura. Por lo tanto, los resultados obtenidos por RIA fueron los seleccionados para el análisis de la relación entre la concentración de cortisol en suero materno y la concentración de cortisol en leche.

Como se mostró en los resultados, la concentración de cortisol en suero es mayor durante las primeras 48 horas y la primera semana de lactancia –no hay diferencias significativas entre estas dos etapas- versus el resto de las etapas de lactancia; una vez que la concentración de cortisol disminuye, ésta se mantiene estable y no hay variaciones entre las etapas a partir del Mes 1. Este se considera un comportamiento adecuado ya que, después del nacimiento, se espera que la concentración de cortisol en suero regrese a su concentración antes del parto y continúe descendiendo durante la lactancia [4].

En la leche, aunque la concentración de cortisol también disminuye, el comportamiento a lo largo de las etapas de lactancia es un poco distinto. La concentración de cortisol en leche es mayor durante las primeras 48 horas que durante la primera semana de lactancia (Media \pm EE: 14.2 ± 2.3 vs 6.1 ± 1.1 , $P < 0.001$) y ésta a su vez, es mayor ($P < 0.05$) que la concentración al Mes 1 de lactancia (Media \pm EE: 2.9 ± 0.5). La concentración de cortisol se mantiene estable cuando la leche ya es madura, a partir del Mes 1 en adelante no hay diferencias significativas en la concentración de cortisol en leche entre etapas ($P > 0.05$). Tanto en suero como en leche la concentración de cortisol disminuye después del parto, sin embargo, uno de los motivos por lo cual su comportamiento no se mimetice podrían ser los cambios que ocurren en la glándula mamaria que afectan su permeabilidad y, por lo tanto, la transferencia de algunos componentes provenientes del suero a la leche.

El resultado del análisis de correlación de Spearman entre las concentraciones de cortisol en suero materno y en leche cuantificadas por RIA fue una correlación positiva ($r_s = 0.770$ y $P = 2 \times 10^{-7}$) con lo cual se cumple la hipótesis propuesta; esto quiere decir que entre mayor es la concentración de cortisol en suero mayor es la concentración de cortisol en leche.

La importancia de este hallazgo radica en la falta de información respecto a cómo se relaciona el cortisol del suero materno con el cortisol en la leche. Como se mencionó con anterioridad, sólo existen dos estudios previos que estudian esta relación; sin embargo, tienen algunas desventajas. Los análisis realizados por Kulski & Hartman (1981) se llevaron a cabo con secreciones de calostro durante el embarazo, lo que no representa realmente lo que sucede durante la lactancia, ya que tanto la concentración de cortisol puede ser distinta, así como la permeabilidad de la glándula mamaria; además el número de pares suero-leche analizados es mucho más pequeño que la del presente estudio ($n=10$ vs $n=145$) y no hubo significancia estadística ($r=0.52$, $P>0.05$). En el estudio reportado por Patacchioli et al. (1992) la relación lineal entre la concentración de cortisol en suero y leche de mujeres entre de los días 1 al 5 post-parto fue estadísticamente significativa ($r=0.5404$, $P<0.001$) [23], sin embargo, no reportan lo que sucede en etapas posteriores como en el presente proyecto.

No sólo la correlación arroja información sobre la relación que hay entre el cortisol en suero y en leche, este resultado es respaldado por el análisis de regresión lineal y de covarianza donde se descubre que no sólo la concentración de cortisol en suero afecta la concentración de cortisol en leche ($F_{1,131}= 165.3505$, $P=2.2\times 10^{-16}$), sino también la etapa de lactancia ($F_{6,131}= 4.0464$, $P= 0.0009$) y la relación que existe entre el cortisol en suero y la etapa ($F_{6,131}= 5.2590$, $P=6.954\times 10^{-5}$). Así, la relación entre cortisol en suero y leche puede tener diferentes características de acuerdo a la etapa; pueden existir factores que afecten en mayor o menor grado la concentración de cortisol en leche de acuerdo a la etapa de lactancia.

Al realizar el análisis de la correlación entre la concentración de cortisol en suero y la concentración de cortisol en leche de forma individual, en todas las etapas hubo una correlación significativa ($P<0.05$) con un coeficiente de correlación (r_s) mayor a 0.65 en todos los casos, lo que quiere decir que la relación observada en el resultado global se mantiene en cada una de las etapas de lactancia. El r_s varía entre las etapas de lactancia y su valor va desde 0.657 a 0.853, así como también varía el valor de P ; estas variaciones en los valores de r_s y P podrían deberse a

los efectos ya mencionados de la etapa de lactancia y la concentración de cortisol en suero sobre la concentración de cortisol en leche.

Los resultados obtenidos del presente estudio sugieren que también los cambios en la permeabilidad de la glándula mamaria asociada a la etapa y al estado de lactancia podrían afectar la transferencia de cortisol del suero a la leche. La permeabilidad de la glándula mamaria disminuye conforme avanza la lactancia. Durante la transición de calostro a leche madura las UE entre las células del tejido mamario se forman y cierran debido a la acción de los glucocorticoides alterando la transferencia de iones y moléculas y, por supuesto, la transferencia de cortisol. Entre menor sea el tiempo transcurrido después del parto, las uniones entre las células estarán más abiertas y el transporte de proteínas plasmáticas y otras moléculas por vía paracelular será mayor. Una elevada concentración de cortisol en leche en las primeras horas de lactancia dependería no sólo de una elevada concentración de cortisol en suero sino también de que hay una vía alternativa a la transcelular que permite una mayor transferencia de cortisol dentro del alveolo mamario. Por ello, es probable que durante la primera semana de lactancia, a pesar que hay una concentración sérica de cortisol elevada al igual que durante las primeras 48 horas, la concentración de cortisol en leche sea menor puesto que las UE están en proceso de formación y todavía no se cierran por completo.

En las últimas dos etapas de lactancia, de 6 a 11 meses y mayor a 12 meses, la concentración de cortisol en leche parece aumentar aun cuando no se observa lo mismo en el suero (**Gráfica 5**); la concentración de cortisol en leche en estas etapas es similar a la de la Primera Semana y el Mes 1 –las cuales con estadísticamente diferentes entre sí- pero menor que en las Primeras 48 horas. Una posible explicación de este hecho es el inicio de la alimentación complementaria; con ello ocurre una disminución de tomas al seno materno, además que no todas las mujeres planean dar lactancia según lo recomendado por la OMS por lo que inician el proceso de destete. Si la leche no es removida del seno, la glándula se distiende y la producción de leche desciende gradualmente [55]. Sumado a esto, se sabe que durante el proceso de destete ocurre una

involución del tejido mamario donde éste regresa a una condición no lactante – aunque la estructura y morfología no es exactamente igual al estado nulíparo- [55], por lo que también las uniones estrechas entre las células que se habían formado comienzan a abrirse nuevamente y podría haber un mayor transporte paracelular de cortisol.

A pesar de que la mayoría de los lactantes iniciaron la alimentación complementaria a partir de los seis meses, pueden existir otros mecanismos diferentes al consumo de otros alimentos y/o la falta de estimulación del seno que se sumen a la explicación de este fenómeno, ya que en el presente estudio había mujeres que practicaban cualquier tipo de lactancia, es decir, que recibían algún otro tipo de leche distinta a la materna desde antes de iniciar la alimentación con sólidos.

En cuanto a la relación que existe entre el cortisol y la composición de la leche, los resultados de los análisis de correlación entre la concentración de cortisol tanto en suero como en leche con la cantidad de proteína y de grasa de la leche no establecen una relación entre ellos, ya que al analizar las diferentes etapas de lactancia individualmente sólo hubo correlación negativa en el Mes 4-5 entre la concentración cortisol en leche y la proteína ($r_s=-0.561$, $P<0.01$) –dato que debe confirmarse con un incremento en el tamaño de muestra puesto que es distinto al resto de las etapas- y durante la Primera Semana entre la concentración de cortisol en leche y la cantidad de grasa ($r_s=-0.538$, $P<0.05$). Al analizar todas las etapas en conjunto hay una correlación negativa entre la cantidad grasa de la leche tanto con la concentración de cortisol en suero ($r_s=-0.245$, $P<0.01$) como con la concentración de cortisol en leche ($r_s=-0.230$, $P<0.01$). Sin embargo, es posible que estos hechos ocurran de forma simultánea sin tener una relación causal, ya que es normal que la concentración de cortisol tanto en suero como en leche disminuyan conforma avanza la lactancia mientras que la grasa aumenta.

Aunque la concentración de cortisol en leche haya tenido una asociación positiva con la cantidad de grasa y proteína de la leche de macacos rhesus [6] y en el presente estudio no haya ocurrido lo mismo, esto puede deberse a las diferencias

en las funciones que posee el cortisol en la producción de leche y funcionamiento de la glándula mamaria entre especies.

Los argumentos anteriormente expuestos ofrecen una explicación teórica a las concentraciones de cortisol en la leche observadas a lo largo de la lactancia. Sin embargo, sería necesario estudiar los mecanismos de transporte de cortisol en la glándula mamaria en diferentes grados de permeabilidad para comprobarlo. Además, aún es necesario realizar otros estudios que ayuden a describir con más detalle los factores que afectan el transporte del cortisol a través de la glándula mamaria y los determinantes del comportamiento del cortisol en la leche humana.

8. RESUMEN DE RESULTADOS

De lo expuesto y discutido en el presente trabajo se pueden destacar los siguientes puntos:

- La concentración de cortisol en suero tiene una correlación positiva con la concentración de cortisol en leche, es decir, que al aumentar el cortisol en suero ocurre un aumento del cortisol en la leche.
- La concentración de cortisol en leche no sólo depende de la concentración de cortisol en suero, sino también de la etapa de lactancia –asociada a la permeabilidad de la glándula mamaria- y de la interacción entre estas dos variables.
- El RIA se consideró un método más adecuado que la quimioluminiscencia para la cuantificación de cortisol en la leche humana ya que puede detectar cantidades muy bajas de cortisol como las que hay en la leche, además de que la manipulación de la muestra es menor debido a que no es necesario purificarla.
- No hay correlación entre la concentración de cortisol en suero o leche con la cantidad de proteína y grasa en las diferentes etapas estudiadas a excepción del cortisol en leche con la grasa en la Primera Semana de lactancia.

9. CONCLUSIONES

En conclusión, en el presente estudio se demostró que la concentración de cortisol en el suero materno tiene una correlación positiva con la concentración de cortisol en leche y que además, esta relación se modifica a lo largo de la lactancia, ya que la concentración de cortisol en leche no sólo se ve afectada por la concentración en suero, sino por la etapa de lactancia y la relación entre estas dos variables. Por lo tanto, la leche funge como un eslabón en la transmisión de la señal glucocorticoide de la madre al hijo. Además, se realizó la cuantificación de cortisol en leche por dos métodos, considerando al RIA un método más adecuado y sencillo que la IQ para tal fin.

El presente estudio es un valioso aporte para entender los factores que influyen en la concentración de cortisol en la leche humana y resalta la importancia de tomar en cuenta la concentración del suero materno cuando se estudia la presencia de cualquier sustancia u hormona en la leche materna que no sea producida por la glándula mamaria. Sin embargo, es necesario continuar profundizando en los aspectos que ayuden a describir con mayor detalle los factores que afectan el transporte del cortisol a través de la glándula mamaria y otros determinantes de la concentración de cortisol en la leche humana.

10. REFERENCIAS

1. Ramamoorthy, S. and J.A. Cidlowski, *Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease*. Rheum Dis Clin North Am, 2016. **42**(1): p. 15-31, vii.
2. Busada, J.T. and J.A. Cidlowski, *Mechanisms of Glucocorticoid Action During Development*. Curr Top Dev Biol, 2017. **125**: p. 147-170.
3. Newton, R., *Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?* Thorax, 2000. **55**(7): p. 603-13.
4. Casey, T.M. and K. Plaut, *The role of glucocorticoids in secretory activation and milk secretion, a historical perspective*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2007. **12**(4): p. 293-304.

5. Grey, K.R., et al., *Human milk cortisol is associated with infant temperament*. Psychoneuroendocrinology, 2013. **38**(7): p. 1178-85.
6. Hinde, K., et al., *Cortisol in mother's milk across lactation reflects maternal life history and predicts infant temperament*. Behav Ecol, 2015. **26**(1): p. 269-281.
7. Li, X.Q., et al., *Roles of glucocorticoids in human parturition: a controversial fact?* Placenta, 2014. **35**(5): p. 291-6.
8. Ballard, O. and A.L. Morrow, *Human milk composition: nutrients and bioactive factors*. Pediatr Clin North Am, 2013. **60**(1): p. 49-74.
9. Kon, I.Y., et al., *The study of breast milk IGF-1, leptin, ghrelin and adiponectin levels as possible reasons of high weight gain in breast-fed infants*. Ann Nutr Metab, 2014. **65**(4): p. 317-23.
10. van der Voorn, B., et al., *Determination of cortisol and cortisone in human mother's milk*. Clin Chim Acta, 2015. **444**: p. 154-5.
11. Kino, T., *Circadian rhythms of glucocorticoid hormone actions in target tissues: potential clinical implications*. Sci Signal, 2012. **5**(244): p. pt4.
12. Pundir, S., et al., *Variation of Human Milk Glucocorticoids over 24 hour Period*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2017. **22**(1): p. 85-92.
13. Gunnar, M.R. and B. Donzella, *Social regulation of the cortisol levels in early human development*. Psychoneuroendocrinology, 2002. **27**(1-2): p. 199-220.
14. Anderson, B.H., et al., *Mutations in CTC1, encoding conserved telomere maintenance component 1, cause Coats plus*. Nat Genet, 2012. **44**(3): p. 338-42.
15. Hahn-Holbrook, J., et al., *Cortisol in human milk predicts child BMI*. Obesity (Silver Spring), 2016. **24**(12): p. 2471-2474.
16. Forns, J., et al., *Association between child cortisol levels in saliva and neuropsychological development during the second year of life*. Stress Health, 2014. **30**(2): p. 142-8.

17. Kent, T.H., L.J. Fischer, and R. Marr, *Glucuronidase activity in intestinal contents of rat and man and relationship to bacterial flora*. Proc Soc Exp Biol Med, 1972. **140**(2): p. 590-4.
18. Neville, M.C., *The physiological basis of milk secretion*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **586**: p. 1-11.
19. Ost, L., et al., *Prednisolone excretion in human milk*. J Pediatr, 1985. **106**(6): p. 1008-11.
20. Berlin, C.M., D.G. Kaiser, and L. Demers, *Excretion of prednisone and prednisolone in human milk*. The Pharmacologist, 1979. **264**(21).
21. Coulam, C.B., et al., *Breast-feeding after renal transplantation*. Transplant Proc, 1982. **14**(3): p. 605-9.
22. Kulski, J.K. and P.E. Hartmann, *Changes in the concentration of cortisol in milk during different stages of human lactation*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1981. **59**(Pt 6): p. 769-78.
23. Patacchioli, F.R., et al., *Maternal plasma and milk free cortisol during the first 3 days of breast-feeding following spontaneous delivery or elective cesarean section*. Gynecol Obstet Invest, 1992. **34**(3): p. 159-63.
24. Benjamin Neelon, S.E., et al., *Correlation between maternal and infant cortisol varies by breastfeeding status*. Infant Behav Dev, 2015. **40**: p. 252–258.
25. Glynn, L.M., et al., *Postnatal maternal cortisol levels predict temperament in healthy breastfed infants*. Early Hum Dev, 2007. **83**(10): p. 675-81.
26. Neville, M.C., *Introduction: tight junctions and secretory activation in the mammary gland*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009. **14**(3): p. 269-70.
27. Stelwagen, K. and K. Singh, *The role of tight junctions in mammary gland function*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2014. **19**(1): p. 131-8.
28. Czank, C., et al., *Hormonal Control of the Lactation Cycle*, in *Textbook of Human Lactation*, T.W. Hale and P. Hartmann, Editors. 2007, Hale Publishing, L.P.: United States. p. 89-111.
29. Neville, M.C. and J. Morton, *Physiology and endocrine changes underlying human lactogenesis II*. J Nutr, 2001. **131**(11): p. 3005S-8S.

30. Gorewit, R.C. and H.A. Tucker, *Glucocorticoid binding in mammary tissue slices of cattle in various reproductive states*. J Dairy Sci, 1976. **59**(11): p. 1890-6.
31. Alexandrova, M., *Glucocorticoid receptor of rat mammary gland during pregnancy and lactation*. Endocrinol Exp, 1986. **20**(2-3): p. 293-300.
32. Chomczynski, P. and L. Zwierzchowski, *Mammary glucocorticoid receptor of mice in pregnancy and in lactation*. Biochem J, 1976. **158**(2): p. 481-3.
33. Brandon, M.R., A.J. Husband, and A.K. Lascelles, *The effect of glucocorticoid on immunoglobulin secretion into colostrum in cows*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1975. **53**(1): p. 43-8.
34. Stelwagen, K., et al., *Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the lactating bovine mammary epithelium*. J Endocrinol, 1998. **159**(1): p. 173-8.
35. Nguyen, D.A., A.F. Parlow, and M.C. Neville, *Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation*. J Endocrinol, 2001. **170**(2): p. 347-56.
36. Xu, L., et al., *Qualitative and quantitative comparison of hormone contents between bovine and human colostrums*. Int Dairy J, 2011. **21**(1): p. 54-57.
37. Hart, S., et al., *Breast milk levels of cortisol and Secretory Immunoglobulin A (SIgA) differ with maternal mood and infant neuro-behavioral functioning*. Infant Behav Dev, 2004. **27**(1): p. 101-106.
38. Sahlberg, B.L. and M. Axelson, *Identification and quantitation of free and conjugated steroids in milk from lactating women*. J Steroid Biochem, 1986. **25**(3): p. 379-91.
39. Groer, M.W., S. Humenick, and P.D. Hill, *Characterizations and psychoneuroimmunologic implications of secretory immunoglobulin A and cortisol in preterm and term breast milk*. J Perinat Neonatal Nurs, 1994. **7**(4): p. 42-51.
40. General Assembly of the World Medical, A., *World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects*. J Am Coll Dent, 2014. **81**(3): p. 14-8.

41. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995, Que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica., 1995: Diario Oficial de la Federación.
42. Neville, M.C., et al., *Studies on human lactation. I. Within-feed and between-breast variation in selected components of human milk.* Am J Clin Nutr, 1984. **40**(3): p. 635-46.
43. Fields, D.A. and E.W. Demerath, *Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF-alpha in human breast milk with infant growth and body composition.* Pediatr Obes, 2012. **7**(4): p. 304-12.
44. Woo, J.G., et al., *Human milk adiponectin is associated with infant growth in two independent cohorts.* Breastfeed Med, 2009. **4**(2): p. 101-9.
45. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
46. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.* J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
47. Mitoulas, L.R., et al., *Variation in fat, lactose and protein in human milk over 24 h and throughout the first year of lactation.* Br J Nutr, 2002. **88**(1): p. 29-37.
48. Bauer, J. and J. Gerss, *Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants.* Clin Nutr, 2011. **30**(2): p. 215-20.
49. Lawrence, R.A. and R.M. Lawrence, *Apendix A. Composition of human milk.*, in *Breastfeeding: a guide for the medical profession.* 2011, Elsevier, Inc.: United States. p. 766-767.
50. Lawrence, R.A. and R.M. Lawrence, *Table 4-7 Fat Distribution in Milk*, in *Breastfeeding: a guide for the medical profession.* 2011, Elsevier, Inc.: United States. p. 98.

51. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.* World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
52. Committee to Reexamine IOM Pregnancy Weight Guidelines, F.a.N.B.a.B.o.C., Youth, and Families., *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines*, K.M. Rasmussen and A.L. Yaktine, Editors. 2009, IOM (Institute of Medicine) and NRC (National Research Council): Washington, DC.
53. Brown, K.H., *WHO/UNICEF review on complementary feeding and suggestions for future research: WHO/UNICEF guidelines on complementary feeding.* Pediatrics, 2000. **106**(5): p. 1290.
54. García Rodríguez, C. and I. Martínez Maldonado, *Ventajas del Método de Quimioluminiscencia frente al de Radioinmunoanálisis (RIA).* Visión Científica, 2007. **1**(2): p. 60-68.
55. Lawrence, R.A. and R.M. Lawrence, *Postlactation Regression of Mammary Gland*, in *Breastfeeding: a guide for the medical profession.* 2011, Elsevier, Inc.: United States. p. 54.

11. ANEXOS

Anexo 1. Carta de consentimiento informado

Anexo 2. Historia clínica

Anexo 3. Formato para la toma de medidas antropométricas de la madre y recolección de información antropométrica del niño.

Anexo 4. Formato para la toma de la muestra sanguínea de la madre

Anexo 5. Formato para la toma de muestra de leche



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CDMX, a

Día	Mes	Año	

Estimada participante

Por favor, tome el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga. Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la Declaración de Helsinki y las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética. Para decidir si participa o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los riesgos y beneficios que esto implica, con el fin de tomar una decisión informada. Este documento le dará información detallada acerca del estudio de investigación titulado **"Relación entre las concentraciones de cortisol en suero y leche maternas"**, el cual podrá comentar con algún miembro del equipo de investigadores. Al terminar de leer este documento se le pedirá que forme parte del proyecto y de ser así, bajo ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

Razón del estudio

La leche materna es una importante vía de comunicación entre la madre y el hijo durante las primeras etapas de la vida. A través de ella se transfiere de la madre al neonato nutrientes y componentes bioactivos, tales como inmunoglobulinas, factores de crecimiento, hormonas, entre otros. Todos estos componentes poseen un papel importante en el crecimiento y desarrollo del neonato, e influyen en la ingesta energética del niño y su metabolismo. La identificación de hormonas involucradas en la regulación del balance energético, tales como el cortisol sugieren que la leche materna es una fuente de componentes críticos en el desarrollo metabólico del niño. Sin embargo, a pesar de que se ha explorado ampliamente la composición de la leche humana y que se han realizado cuantificaciones de cortisol en la leche, aún no se ha reportado una asociación de las características maternas con las concentraciones de la hormona. Dado que la lactancia se recomienda de forma exclusiva durante los primeros seis meses de vida y complementaria hasta los dos años, resulta relevante conocer la influencia del estado nutricional materno sobre la concentración de hormonas y componentes en la leche humana. Los resultados obtenidos en el presente proyecto nos permitirán ampliar los conocimientos de los mecanismos de programación durante la lactancia.





CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



CDMX, a

Día	Mes	Año	

A quien corresponda.

Yo _____ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio. **"Relación entre las concentraciones de cortisol en suero y leche maternas"**, que se realiza en el Hospital Materno Infantil Magdalena Contreras en conjunto con el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y cuyos objetivos consisten en: cuantificar la concentración de cortisol en la leche y el sueromaterno en diferentes momentos de la lactancia para evaluar si hay correlación entre ambas concentraciones; y realizar un análisis de la composición química y nutricional de la leche y su relación con las concentraciones de cortisol.

Estoy consciente de que los procedimientos, pruebas y tratamientos para lograr los objetivos mencionados consisten en lo siguiente:

1. Entrevista (durante la primera etapa), donde se obtendrá información sobre la historia clínica durante el embarazo y del expediente clínico. Se medirá peso y talla. Cada medida será tomada 2 veces por personal ampliamente capacitado, para minimizar las posibles molestias. En el caso del hijo(a) solamente se dará la información del peso y talla.
2. En tres etapas durante la lactancia: se pesará a la madre, se tomará una muestra de leche materna con un tira-leches, para conocer la composición y la concentración de una hormona llamada cortisol. La extracción de leche materna consiste en recolectar una muestra de leche (2-140mL) con una bomba extractora eléctrica, que simula la succión del bebé, nose debe amamantar con uno de los dos senos al niño hora y media previa a la toma de la muestra. El uso de tira-leches en ocasiones puede causar un poco de molestia al extraer la leche, como ocurre cuando el bebé succiona el pecho, pero no debe causar dolor ni daño a la piel o pezones. Su uso esporádico tampoco interfiere con la producción de leche. Por comodidad y seguridad, la velocidad de extracción se determinará de manera personalizada y se realizará por personal altamente capacitado, lo que disminuye el posible riesgo de incomodidad e irritación temporal en los pezones. Es importante señalar que el tira-leches siempre será esterilizado para su uso.
3. En las tres etapas de lactancia también: se le tomará una muestra de sangre de aproximadamente 6ml para medir la concentración de cortisol en suero. La toma de la muestra se realizará media hora antes de la obtención de la leche. Así mismo, se obtendrán datos de los análisis clínicos previos al parto.

Las mediciones antropométricas, las muestras de leche y obtención de sangre son obtenidas por personal ampliamente capacitado. La sujeto experimental se deberá presentar en condiciones de ayuno mínimo de 8 horas y no deberá alimentar al niño o extraerse leche del seno del que se extraerá la muestra al menos 1.5 horas antes de la toma de la muestra de leche.

Las entrevista y aplicación de cuestionarios y obtención de mediciones tendrán una duración aproximada de 60 minutos.

Estoy consciente de que los riesgos para mi persona son los siguientes: Al momento de la toma de muestra de sangre, se podría presentar un leve dolor y posteriormente un pequeño moretón, sin embargo esto no tiene ninguna implicación de riesgo para la salud. El material que se usará para la toma de muestra siempre será nuevo (estéril) y desechable. Algunas de las molestias relacionadas con la extracción de leche materna se mencionaron en la parte superior al describir la técnica y tampoco generan un riesgo para la salud. La obtención de la muestra de leche, la cantidad total que se extraerá del seno materno es una cantidad que puede fluctuar entre 2 a 140ml de leche aproximadamente, cantidad que no afectará la alimentación del niño en ese día, ni representa ningún riesgo para la producción de la leche. El seno materno producirá de nuevo leche, ya que estos se llenan continuamente. En el caso de que la extracción de leche moleste o genere dolor por el uso del tira-leches puedo decidir interrumpir el proceso y no dar la muestra de leche, sin que esto tenga alguna consecuencia para mi persona.

Las muestras biológicas serán transportadas al *Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán* donde se guardarán y analizarán.

Autorizo que se guarde la muestra de leche y sangre que sobrepore 3 años, en caso de que se requiera repetir o requerir algún otro tipo de medición para este o estudios futuros.

Entiendo que del presente estudio se derivarán los siguientes beneficios: Conocer la concentración de cortisol en la sangre y la leche materna y su relación con la composición química, nutricional y propiedades de la leche materna. Además, que se me brindará en caso



de que así lo desee aconsejaría en lactancia para resolver cualquier duda o dificultad al respecto y un pequeño obsequio para los bebés como agradecimiento que será entregado cuando terminen la participación.

Entiendo que toda la información obtenida será de carácter estrictamente confidencial:

En ningún caso la información brindada por la persona será asociada con la persona o con datos relativos a su identidad, sólo serán utilizados por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito, salvo en ocasiones, el personal autorizado de las instituciones participantes (Comité de Ética) podría solicitar revisarlas. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrán ser identificados (as) los participantes en el estudio. Los datos aportados se procesarán a través de códigos. Los resultados del estudio no serán incluidos en el expediente médico y no afectarán la atención médica que se proporciona en el hospital, clínica o cualquier otra instancia de salud.

Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que yo así lo desee. También que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio

Así mismo, cualquier asunto relacionado con esta investigación podré consultarlo con el Jefe de Enseñanza e Investigación de la unidad de atención; <Dr. José Luis Sánchez Monroy, Tel.(55) 5683 5094, Av. Luis Cabrera 619, La Magdalena Contreras, San Jerónimo Lídice, CP 10200 Ciudad de México>, con las investigadoras <LN. Emma Marcela Centurión Murillo, Tel. (55) 5487 0900 ext.2417 Cel.(443)2531079, correo electrónico-mail: centurión.emma@gmail.com, Dpto. de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán: Avenida Vasco de Quiroga No.15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Delegación Tlalpan C.P.14080 Ciudad de México> y <Dra.Elena Zambrano González, Tel. (55) 5487 0900 ext. 2417, Dpto. de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán Cel. (55)54090990>. También puede hablar con el presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga. Teléfono: 54870900 ext. 6101). En caso de algún trastorno relacionado con esta investigación, el Jefe de Enseñanza e Investigación comunicará el evento a la Dirección de Educación e Investigación de la SSDF, en donde se decidirá la necesidad de convocar al investigador principal y al Cuerpo colegiado competente, para su resolución. Cuando el trastorno se identifique como efecto de la intervención, la instancia responsable deberá atender médicamente al paciente hasta la recuperación de su salud o la estabilización y control de las secuelas.

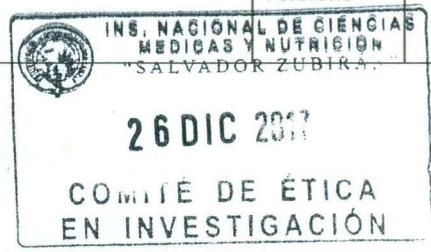
En caso de que decidiera retirarme, la atención que como paciente recibo en esta institución no se verá afectada.

Nombre.		Firma.
(En caso necesario, datos del padre, tutor o representante legal)		
Domicilio.	Teléfono	

Nombre y firma del testigo.		Firma.
Domicilio.	Teléfono	

Nombre y firma del testigo.		Firma.
Domicilio.	Teléfono	

Nombre y firma del Investigador responsable.		Firma.
Domicilio.	Teléfono	



c. c. p. Paciente o familiar
c. c. p. Investigador (conservar en el expediente de la investigación)



RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CORTISOL EN SUERO Y LECHE MATERNOS.

#4HISTORIA CLÍNICA DE LA MADRE

DATOS PERSONALES

		1. Folio:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
2. Fecha:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
3. Número de registro:	_____				
4. Nombre:	_____				
5. Edad:	_____	6. Fecha de nacimiento:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
7. Teléfono:	_____				
8. Celular:	_____				

ANTECEDENTES GENERALES

1. ¿Padece alguna enfermedad como hipertensión arterial, enfermedades hipertensivas del embarazo, enfermedades renales, hepáticas, cardíacas, vasculares o cualquier otra alteración endócrina u otra relevante?	<input type="checkbox"/>
1. Sí ¿Cuál? _____	
2. No	
2. ¿Se le ha realizado alguna cirugía?	<input type="checkbox"/>
1. Sí ¿Cuál? _____	
2. No	
3. ¿Ha recibido transfusiones sanguíneas?	<input type="checkbox"/>
1. Sí 2. No	
4. ¿Consumía alcohol previo al embarazo?	<input type="checkbox"/>
1. Sí 2. No	
5. ¿Fumaba previo al embarazo?	<input type="checkbox"/>
1. Sí 2. No	
6. ¿Consumía café u otras bebidas con cafeína previo al embarazo?	<input type="checkbox"/>
1. Sí 2. No	
Observaciones:	_____

HISTORIA OBSTÉTRICA

1. Número de gestas:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	2. Número de partos:	<input type="text"/>	<input type="text"/>
----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------



RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CORTISOL EN SUERO Y LECHE MATERNOS.

3. Número de cesáreas: 4. Número de abortos:

5. Antecedentes obstétricos a destacar: _____

6. ¿Ha lactado anteriormente? 1. Sí 2. No 0. No aplica

ÚLTIMO EMBARAZO/PARTO (ACTUAL)

7. FUM:

8. Talla: . cm

9. Peso previo al embarazo:

10. Peso máximo registrado: . Kg SDG Fe

11. Último peso registrado: . Kg SDG Fe

12. Peso post-parto (primeras 48h): . Kg SDG: ne

13. Incidencias durante el embarazo: 1. Sí 2. No

14. ¿Cuáles?

- 1. Intolerancia a HC o diabetes gestacional
- 2. Preeclampsia o desórdenes hipertensivos
- 3. Amenaza de parto prematuro
- 4. Ruptura prematura de membranas
- 5. Hemorragias
- 6. Otros: _____

Observaciones: _____

15. Medicamentos o suplementos durante el embarazo: 1. Sí 2. No

Medicamento/Sup	¿Desde cuándo?

16. Consumo de alcohol:
1. Sí 2.No

17. Consumo de tabaco:
1. Sí 2.No

18. Consumo de café o bebidas con cafeína
1. Sí 2.No



RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CORTISOL EN SUERO Y LECHE MATERNOS.

Recién nacido

19. Fecha de nacimiento:
20. Hora de nacimiento (horario de 24h): :
21. Sexo:
1. Femenino 2. Masculino
22. Peso:
23. Talla: . cm
24. Vía de nacimiento:
1. Parto vaginal 2. Cesárea
25. APGAR: /
26. Edad gestacional: SDG
27. ¿Planea dar pecho?
1. Sí 2. No
28. ¿Ha recibido algún otro tipo de leche a parte de la materna?
1. Sí ¿Cuál? _____ 2. No

USO DE ANTICONCEPTIVOS/SUPLEMENTOS (ACTUAL)

29. ¿Utiliza algún método anticonceptivo?
1. Sí 2. No
30. ¿Cuál? _____
31. ¿Consumo algún suplemento? 1. Sí 2. No

Medicamento/Sup	¿Desde cuando?

Código del encuestador:

Observaciones:



RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CORTISOL EN SUERO Y LECHE MATERNOS.



#1 ANTROPOMETRÍA DE LA MADRE

1. Número de folio del participante	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
2. Número de registro	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
3. Nombre de la madre:	_____
4. Código del entrevistador	<input type="text"/> <input type="text"/>
5. Fecha de la medición	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
6. Hora de la medición (considere horario de 24 horas)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
7. Peso (Kg)	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/>
8. Talla (cm)	<input type="text"/>
9. IMC (Kg/m ²)	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/>
10. Grasa corporal (%)	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/>
11. Músculo (%)	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/>
12. Grasa visceral	<input type="text"/> / <input type="text"/>

ANTROPOMETRÍA NIÑO

1. Fecha de la medición	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
2. Edad (días)	<input type="text"/> <input type="text"/>
3. Hora de la medición (considere horario de 24 horas)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
4. Peso (Kg)	<input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
5. Talla (cm)	<input type="text"/> <input type="text"/>

Observaciones: _____ _____ _____
--



#2 MUESTRA DE SANGRE DE LA MADRE

1. Número de folio del participante	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
2. Número de registro	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
3. Código del muestrista	<input type="text"/> <input type="text"/>
4. Fecha de toma de la muestra	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
5. Hora de la última comida (horario de 24h)	<input type="text"/> <input type="text"/> : <input type="text"/> <input type="text"/>
6. ¿Se realizó la muestra? 1=Sí 2=No	<input type="text"/>
7. Hora en que se tomó la muestra (horario de 24h)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
8. ¿Qué cantidad de la muestra venosa se obtuvo?	<input type="text"/> <input type="text"/>
9. ¿Qué cantidad de alícuotas de plasma se obtuvieron?	<input type="text"/>

Observaciones:

EVALUACIÓN DE ESTRÉS

1. Nivel de estrés de la paciente	<input type="text"/>										
<table border="1"><thead><tr><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th></tr></thead><tbody><tr><td>Nada estresada</td><td>Poco estresada</td><td>Moderadamente estresada</td><td>Estresada</td><td>Muy estresada</td></tr></tbody></table>	1	2	3	4	5	Nada estresada	Poco estresada	Moderadamente estresada	Estresada	Muy estresada	<input type="text"/>
1	2	3	4	5							
Nada estresada	Poco estresada	Moderadamente estresada	Estresada	Muy estresada							
2. ¿El bebé está llorando? 1.Sí 2.No	<input type="text"/>										
3. ¿La paciente se encuentra angustiada? 1.Sí 2.No	<input type="text"/>										
Observaciones:											
<hr/> <hr/> <hr/>											



#3MUESTRA DE LECHE DE LA MADRE

1. Número de folio del participante	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
2. Número de registro	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
3. Nombre de la madre: _____	
4. Código del entrevistador	<input type="text"/> <input type="text"/>
5. Mes de lactancia	<input type="text"/>
6. Fecha de toma de la muestra	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
7. Fecha del nacimiento del niño	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
8. Hora de toma de la muestra (horario de 24h)	<input type="text"/> <input type="text"/> : <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> : <input type="text"/> <input type="text"/>
9. ¿Le da pecho al niño? 1.Sí 2.No	<input type="text"/>
10. ¿De qué seno se extrajo la muestra? 1. Derecho 3. Ambos 2. Izquierdo 4. Ninguno	<input type="text"/>
11. Hora de la última tetada (horario de 24h)	<input type="text"/> <input type="text"/> : <input type="text"/> <input type="text"/>
12. Tiempo entre la última tetada del seno donde se tomó la muestra y la toma de la muestra (horario de 24h) pregunta 8	<input type="text"/> <input type="text"/> : <input type="text"/> <input type="text"/>
13. ¿De qué seno le dio de comer la última vez? 1. Derecho 3. Ambos 2. Izquierdo 4. Ninguno (pase a la pregunta 21)	<input type="text"/>
14. ¿Cuánto tiempo le dio de comer del seno? (marcar el tiempo en minutos, 00 si no aplica)	<input type="text"/> <input type="text"/>
15. ¿Consumió otros líquidos su niño? 1. Sí 2.No (pase a pregunta 17)	<input type="text"/>
16. ¿Cuáles líquidos? 1. Agua 2. Fórmula ¿Cuál? _____ 3. Atole 4. Té 5. Jugo	<input type="text"/>
17. ¿Consumió otros alimentos sólidos? 1. Sí ¿Cuáles? _____ 2. No	<input type="text"/>
18. Método de extracción de la muestra 1. Bomba eléctrica 3. Manual	<input type="text"/>



RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CORTISOL EN SUERO Y LECHE MATERNOS.



2. Bomba mecánica

4. Ninguna

19. Volumen total recolectado

ml

20. Número de alícuotas obtenidas

21. Interferencia en la medición

1. Si ¿Cuál? _____

2. No

Observaciones:
