



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE LOS
ANTICUERPOS ANTI HSV-I EN LECHE MATERNA DE MUJERES CON
MASTITIS SUBCLINICA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:

RICARDO RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. FERNANDO M. GUERRA INFANTE

ASESOR DE TESIS
Q.B.P. GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS



MEXICO D.F. 2009



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.

ESTA TESIS SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE VIROLOGIA,
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA E INFECTOLOGIA DEL INSTITUTO
NACIONAL DE PERINATOLOGÍA "ISIDRO ESPINOZA DE LOS REYES"

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Guadalupe y Eduardo, por su apoyo incondicional, y estar conmigo en las buenas y en las malas, y enseñarme que nunca debo de darme por vencido.

A mis hermanos María Eugenia, Magdalena, Octavio, Roberto, Demetrio y Saúl, por estar siempre conmigo en todo momento.

A mis tíos Guillermina y Eugenio (q.e.p.d.), por apoyarme y darme ánimos en el transcurso de la carrera.

A mis amigos y amigas de la FES, que gracias a ellos viví los mejores años de mi vida, y supe lo que es la amistad sincera y desinteresada.

A las maravillosas personas que conocí en el INPer, Marcela, Gabriel, Juan Manuel, Saúl, Selene, Marcos, Verónica y especialmente al Doctor Guerra, por darme su confianza, consejo y su amistad sincera.

ÍNDICE GENERAL	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	III
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	
ANATOMÍA DE LA MAMA	3
CAMBIOS DURANTE LA LACTANCIA	5
CARACTERÍSTICAS ANTIMICROBIANANAS DE LA LECHE	5
VENTAJAS INMUNOLÓGICAS DE LA LECHE MATERNA	7
MASTITIS	8
EPIDEMIOLOGIA DE LA MASTITIS	9
CAUSAS DE LA MASTITIS	10
MASTITIS SUBCLÍNICA	11
INTERLEUCINA 8	12
LECHE E INFECCIONES VIRALES	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
OBJETIVOS	
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVO PARTICULAR	17
HIPÓTESIS	18
DISEÑO EXPERIMENTAL	
POBLACIÓN DE ESTUDIO	19
CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN	19
VARIABLES	20
MATERIAL BIOLÓGICO	20

MATERIAL DE LABORATORIO	20
EQUIPO	21
REACTIVOS	21
MÉTODOS	
PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS	22
TITULACIÓN DEL HSV TIPO 1 POR EL MÉTODO DE DOSIS INFECTIVAS PARA CULTIVO DE TEJIDOS AL 50% (DICT ₅₀)	23
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	24
INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS	24
OBSERVACIÓN DEL DAÑO CELULAR	25
CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO CELULAR	25
OBSERVACIÓN DEL DAÑO CELULAR	26
TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE IL-8 (POR INMUNODIFUSIÓN RADIAL)	27
TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE IL-8 .	27
DISEÑO ESTADÍSTICO	29
TITULACIÓN DEL HSV TIPO 1 POR EL MÉTODO DE DOSIS INFECTIVAS PARA CULTIVO DE TEJIDOS AL 50% (DICT ₅₀)	30
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS	43
APENDICE 1	A1
APENDICE 2	A2
APENDICE 3	A3

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Pág.
1	Anatomía de la mama	3
2	Estructura general del Herpes Virus	14
3	Células VERO no infectadas	25
4	Células VERO infectadas	25
5	Células VERO protegidas	25
6	Preparación de las diluciones estándar de IL-8/NAP -1	27
7	Acomodo final de la microplaca	27
8	Niveles de IL 8 en leche humana	32
9	Niveles de IgA en leche humana	33

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		Pág.
1	Componentes de la leche humana con propiedades inmunológicas	6
2	Niveles de IL-8 e IgA de leche materna en los percentiles 25, 50 y 75	31
3	Niveles de IL-8, IgA y actividad neutralizante de leche de mujeres con dolor en mamas	34
4	Niveles de IgA y de la actividad neutralizante acorde a los percentiles 25, 50 y 75 de IL-8 en leche materna	36
5	Niveles de IL-8 y de la actividad neutralizante acorde a las percentiles 25, 50 y 75 de IgA en leche materna	38

INTRODUCCIÓN

La leche materna se considera el alimento ideal para el recién nacido durante los primeros 4 a 6 meses de vida. La ventaja significativa de la lactancia materna es la protección que la leche le confiere al recién nacido contra infecciones. La leche humana contiene unos 4,000 leucocitos/mm³, la mayor parte son macrófagos que fagocitan y matan microorganismos. El resto de los leucocitos son linfocitos (T, B y células nulas), algunos polimorfonucleares y células epiteliales. Además la leche presenta anticuerpos IgA, IgM e IgG los cuales le dan protección al recién nacido contra los diversos patógenos del medio ambiente.

En algunas ocasiones la glándula mamaria puede mostrar una afección inflamatoria, que puede acompañarse o no de infección. Uno de los factores importantes para un proceso inflamatorio de la glándula mamaria es el vaciamiento ineficaz de la leche del pecho, lo cual puede desarrollar una infección de uno o ambos senos causada por la contaminación bacteriana de una grieta del pezón, por la obstrucción de los conductos lactíferos o por una severa congestión de las glándulas mamarias. Por lo general es secundaria a las grietas del pezón, esta infección afecta a una de cada 20 mamás que amamantan. Aunque la mastitis puede aparecer en cualquier período de la lactancia, es frecuente entre los 10 y 28 días post parto. Se puede contraer mastitis de una vez y generalmente se presenta en un solo seno.

Se ha descrito una afección llamada *mastitis subclínica*, la cual se caracteriza por desarrollar una inflamación del pecho sin signos ni síntomas de mastitis.

Esta mastitis subclínica sólo puede ser diagnosticada a partir de un aumento en los niveles de sodio - potasio o de interleucina - 8 (IL-8). Esta última es una quimiocina con actividad proinflamatoria. Además en una mastitis clínica los niveles de IgA e IgG se encuentran elevados, lo cual en muchos casos beneficia al infante proporcionándole protección pasiva en contra de los patógenos locales causantes de la mastitis. En el caso de la mastitis subclínica no se tiene una evidencia si los niveles de anticuerpos se encuentran aumentados o disminuidos en la leche de estas mujeres, y menos aún si aumentan los niveles de anticuerpos específicos contra algún patógeno. Es por ello que el objetivo de esta tesis fue examinar los niveles de IgA y la actividad neutralizante de la leche en contra del virus del herpes simple tipo 1 en la leche de mujeres con mastitis subclínica, mediante la medición de los porcentajes de neutralización utilizando cultivos de células VERO, que son susceptibles a este virus.

MARCO TEÓRICO

ANATOMÍA DE LA MAMA

La mama es considerada como una glándula sudorípara modificada de la piel, adaptada para la producción de leche, una secreción de valor nutricional alto, adecuadamente adaptada para las necesidades de los recién nacidos y única fuente de alimento durante los primeros meses de vida. La glándula mamaria limita en su cara posterior con la aponeurosis o fascia del músculo pectoral y contiene abundante tejido graso en donde no hay tejido glandular. La grasa y el tejido conectivo, junto con los ligamentos de Cooper (que unen la glándula a la piel) constituyen los elementos que dan forma y sostén a la mama. La mama, además, contiene vasos arteriales, venosos y linfáticos, así como elementos nerviosos, es casi totalmente simétrica (la izquierda es de mayor tamaño que la derecha en la mayoría de los casos) situada en el tórax bajo la piel y siendo atrófica en el varón.^(1,2)(Figura 1)



Figura 1.- Anatomía de la mama. (IMAGEN TOMADA DE

http://www.medela.cl/breastfeeding/img/bre_breast_detail_web_sp_l.jpg (17/10/2008 14:22))⁽³⁾

En la base del complejo areola-pezón se localizan ciertos elementos conocidos como células mioepiteliales. Estas células son estrictamente epiteliales en cuanto a su origen, aunque con la particularidad de que son capaces de moverse a la manera de las fibras musculares. Estas células mioepiteliales provocan la salida de la leche almacenada en los galactóforos y la erección del pezón ante estímulos como succión, roce, tacto y frío.

La glándula mamaria consta de dos elementos fundamentales: los acinos glandulares, donde se encuentran las células productoras de leche y los ductos, conjunto de estructuras arboriformes o ramificadas, tubulares y huecas, cuyas luces confluyen progresivamente en canalículos y gruesos hasta terminar en uno de los doce a dieciocho galactóforos. Los galactóforos son dilataciones ductales a modo de reservorios situados inmediatamente por detrás del pezón.

Durante el embarazo las mamas se vuelven turgentes y aumentan de tamaño. La pigmentación de la piel de la areola y del pezón aumenta muy notablemente y aparecen unas pequeñas eminencias granulares en los bordes de las areolas conocidos como tubérculos de Morgagni, correspondientes al desarrollo de glándulas sebáceas prominentes. La circulación de la mama aumenta y se hacen patentes las venas superficiales, sobre todo en las mujeres de raza caucásica, efecto que se incrementa durante la lactancia. Los pezones se ensanchan y por los poros lactíferos se expulsan, de manera o menos patente, un material acelular, espeso, llamado comedones que corresponden a tapones de queratina que hasta entonces obturaban los ductos en su extremo final. ^(4,5)

CAMBIOS DURANTE LA LACTANCIA

La lactancia tiende a mantener los cambios ocurridos durante el embarazo. La producción de leche en las mamas comienza inmediatamente después del parto. Al cabo de 12 a 24 horas la mama segrega calostro, un líquido espeso al que se atribuyen propiedades laxantes (tiene un contenido en colesterol elevado) que facilitaría la evacuación del meconio del intestino del recién nacido. Pocas horas después la mama deja de producir calostro para secretar leche normal.

CARACTERÍSTICAS ANTIMICROBIANAS DE LA LECHE HUMANA.

La leche materna contiene una variedad de sustancias antimicrobianas (relativamente resistentes contra proteólisis intestinal que proporciona la protección al infante (Tabla 1).

Los factores inmunológicos que contiene la leche y que son considerados protectores contra las infecciones y que pueden modular la inflamación en los alvéolos mamarios son: La lactoferrina, una glicoproteína de 703 aminoácidos, se encuentra en elevadas concentraciones en la leche humana y tiene acciones bacteriostáticas y bactericidas. La lisosima, una proteína de cadena simple de 12-kDa, lisa a las bacterias susceptibles atravesando los peptidoglicanos de las paredes de células bacterianas. El inhibidor de la secreción de la proteasa del leucocito (SLPI), es un inhibidor de la proteasa sérica de 11.7-kDa, protege tejidos finos contra la degradación por las proteasas que son lanzados por los neutrófilos, tales como elastasa y

caseína G. Dos quimiocinas, interleucina-8 (IL-8) y RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted); se encuentran en concentraciones relativamente elevadas en leche humana. La IL-8 se produce en respuesta a estímulos inflamatorios y desempeña un papel en el reclutamiento y la activación de neutrófilos y de linfocitos. RANTES, una quimiocina producida por los linfocitos, células NK, y las células epiteliales mamarias, están implicadas en la quimiotaxis de macrófagos. Durante la mastitis clínica evidente, la lactoferrina, la lisozima, y los niveles de IL-8 se incrementan en la leche de humanos y de bovinos.⁽⁶⁻⁹⁾

TABLA 1⁽⁶⁾

<i>Componentes de la leche humana con propiedades inmunológicas</i>	
Neutrófilos	Componentes Secretores libres
Linfocitos	Oligosacáridos y probióticos
Lactoferrina, lactoferricina B y H	Compuestos anti-inflamatorios
Lizosima	Ácidos grasos
Macrófagos	Citocinas: TGF β e IL-10
Lactoperoxidasa	Receptores antagonistas de IL-1
Lactoferrina	Receptores de TNF α e IL-6
Nucleótido-hidrolizantes	sCD14
κ -Caseína y α -lactoalbumina	Complemento y receptores del complemento
Péptidos de la leche	Ácidos grasos de cadena larga no poliinsaturada
Haptocorrina	β -Defensina-1
Ácidos grasos de cadena larga poliinsaturada	Factor bifido
Mucinas	Hormonas y factores de crecimiento
Lactaderina	Anticuerpos anti-idiotípicos
Nucleótidos	

VENTAJAS INMUNOLÓGICAS DE LA LECHE MATERNA.

Una de las ventajas significativas de la lactancia materna es la protección que confiere contra infecciones; esto no puede duplicarse en una fórmula pediátrica, pues la leche humana contiene factores tanto celulares como humorales. La lactancia materna promueve la colonización de *Lactobacillus bifidus* en el colon. Cuando predomina este anaerobio gram positivo, en vez de *E. coli* y bacteroides, se suprime el crecimiento de estafilococos, shigelas y protozoarios. Además, son menos probables las infecciones entéricas por *E. coli*.

Estas y otras propiedades antiinfecciosas de la leche humana son de su máxima importancia en niños de los países menos desarrollados. Las infecciones intestinales son la causa principal de mortalidad infantil en todo el mundo. En los países donde el abastecimiento de agua está mal regulado, y la diarrea en lactantes es común, se debe recomendar la lactancia humana. ^(10 - 12)

MASTITIS

La mastitis es un proceso inflamatorio y purulento de los alvéolos, cisternas, senos, conductos glandulares y espacios intersticiales de la glándula mamaria, en algunos casos hay metástasis, produciéndose infección generalizada. La mastitis puede ser aguda o crónica, la primera es de corta duración, frecuentemente febril y con síntomas muy evidentes; la segunda es de tipo insidioso por lo que al principio pasa desapercibida hasta que después de una evolución lenta, se manifiesta por lesiones claras, así como también por la disminución en la producción de leche y alteración en su calidad. La mastitis más común es la crónica.⁽¹³⁾

Los criterios clínicos para considerar que existe una mastitis son enrojecimiento, aumento de la temperatura del pecho, dolor, fiebre, y/o puede presentar malestar y fatiga. Los marcadores bioquímicos incluyen decremento en los niveles de lactosa, niveles elevados en la concentración de Na^+ , Cl^- , K^+ , y lactoferrina.^(14 - 16)

EPIDEMIOLOGÍA DE LA MASTITIS.

La mastitis es relativamente común, reportándose de un 5 a un 33% de mujeres en lactancia. El problema ocurre comúnmente en los primeros tres meses de la alimentación, con una frecuencia del 74 al 95%. Generalmente es unilateral y raramente se convierte en destete. El absceso es raro después de las primeras seis semanas de la lactancia. Algunas madres pueden sufrir de mastitis recurrente con un mismo infante o en embarazos sucesivos. La tradición y los textos sostienen que la mastitis es causada con frecuencia por el estancamiento de la leche. El estancamiento de la leche solamente es un estímulo de gran alcance al pecho y al desarrollo de la fiebre maternal. En diversas sociedades las varias prácticas culturales se han convertido para prevenir el estancamiento, tal como el uso del masaje o de usos herbarios para promover la expresión de la leche antes y después del nacimiento. En algunas ocasiones sin embargo, la infección es fácilmente perceptible pues las cuentas bacterianas aumentan. Los patógenos comunes cultivados son *Staphylococcus aureus*, seguido del *Streptococcus spp.*, Bacterias Gram negativas tales como *Escherichia coli*, o mezclas de organismos. *Salmonella spp* y *Candida* se han identificado en casos raros. Por ejemplo, *S. aureus* es el responsable de la mayoría de las epidemias intrahospitalarias adquiridas de mastitis puerperal. Estos organismos colonizan con frecuencia a madres. En un estudio longitudinal conducido durante un año en infantes criados al pecho, Lindberg et al ⁽⁸⁾, identificaron la toxina producida por especies de *Streptococcus spp* tanto en la leche materna como en las heces infantiles,

demonstrando la colonización a largo plazo, sin efecto clínico o bvio sobre madres o infantes.

La mastitis es frecuente en la segunda y tercera semanas postparto, y la mayoría de estudios señalan que entre el 74% y el 95% de los casos ocurren en las primeras 12 semanas. Sin embargo, puede ocurrir en cualquier momento de la lactancia, incluso en el segundo año. El absceso mamario también es frecuente en las primeras 6 semanas postparto, pero puede ocurrir tarde.⁽⁷⁾

CAUSAS DE LA MASTITIS

Como se menciono anteriormente, las dos principales causas de la mastitis son el *estancamiento de la leche* y la *infección*. El estancamiento de la leche es habitualmente la causa primaria y ésta puede acompañarse o progresar hacia la infección o no hacerlo, por lo tanto una extracción eficaz de la leche reducirá en gran parte esta afección. ⁽¹⁷⁾

MASTITIS SUBCLINICA

Los estudios en humanos han demostrado cambios bioquímicos en la leche, y en animales domésticos hay evidencia de cuantas bacterianas crecientes. La mastitis subclínica conduce a cambios en las uniones entre las células del epitelio luminal, por lo consiguiente hay un aumento en la salida de sodio, de células inflamatorias, y otros mediadores en la leche. La leche materna “normal”; contiene 1 mmol de sodio, esto aumenta en la mastitis subclínica de 12 a 20 mmol. A pesar de lo anterior estas mujeres con mastitis subclínica están lactando normalmente o no tienen ningún dolor del pecho. La mastitis subclínica se presenta en forma unilateral en la mayoría de mujeres. La importancia clínica de la mastitis subclínica no es clara. ^(17 - 20)

Se piensa que el aumento de los niveles de IL-8 (de entre 63 a 2000 pg/mL) indica que está ocurriendo una respuesta inflamatoria, a pesar de la ausencia de signos clínicos. Se ha encontrado que la mastitis subclínica es común entre las mujeres en Bangladesh, Tanzania, Malawi y Sudáfrica. También se ha observado un aumento de la relación sodio-potasio en la leche materna asociado con escasa ganancia ponderal de los niños, a pesar de que el niño reciba alimentos suplementarios, o cuando el número de tomas está disminuido, de tal manera que la producción de leche es menor de 400 mL al día. Esto sugiere que la mastitis subclínica puede estar asociada con un vaciamiento inadecuado de la leche. ⁽⁷⁾

Interleucina 8

La IL-8 integra la familia de citoquinas inflamatorias de bajo peso molecular que han sido referidas como quimocinas, entre las cuales la IL-8 es la mejor caracterizada. Estas citocinas presentan la particularidad estructural que las caracteriza, la presencia de cuatro residuos conservados de cisteína. Actúa como factor quimiotáctico y activante para los neutrófilos y en menor grado para los basófilos y los linfocitos.

La IL-8 es producida por fagocitos mononucleares, Linfocitos T activados, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos, células endoteliales, plaquetas, queratinocitos, hepatocitos, condrocitos, astrocitos y células NK.

El ADNc humano indica que el precursor proteico posee 99 aminoácidos, el cual genera una proteína madura de 8 kDa. A pesar de que la IL-8 es capaz de generar puentes disulfuro intercatenarios, no está aclarado aún si la forma biológicamente activa está constituida por la forma monomérica o dimérica. Se han obtenido productos maduros que difieren el número de aminoácidos que los constituyen (69 – 72 – 77 aminoácidos) dependiendo de la fuente celular utilizada. El péptido de 72 aminoácidos es el que posee mayor potencia biológica, este hecho sugiere la existencia de un mecanismo de activación que podría requerir de una división proteolítica.

La IL-8 ejerce además gran número de actividades pro-inflamatoria, produce degranulación de los neutrófilos, induce la expresión de moléculas de adhesión y favorece así la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales. Posee

efecto co-mitogénico para los queratinocitos y actúa como factor autocrino en ciertos melanomas. ^(21, 22)

Leche e infecciones virales

Aunque la leche es considerada como un alimento así como un factor protector contra los patógenos comunes del medio ambiente, también se ha asociado como un factor de riesgo para la adquisición de algunas infecciones virales, como es el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Por ejemplo, en mujeres VIH-positivas se ha asociado con el desarrollo de una mastitis subclínica y un aumento de la carga viral en la leche materna de estas mujeres, esto es considerado como un factor mayor de tasas de transmisión vertical (madre-hijo) del VIH. Se ha observado una tasa de transmisión vertical del VIH 20 veces mayor cuando existe mastitis clínica. Otro virus transmitido en menor frecuencia por la leche es el virus herpes simple (HSV) ^(23, 24).

El herpes es causado por dos virus llamados virus herpes simple tipo 1 (HSV-1) y virus herpes simple tipo 2 (HSV-2). Los virus herpes simple pertenecen a la familia de los *Herpesvirus*, están muy distribuidos a nivel mundial. El HSV es un virus de tamaño medio envuelto de doble cadena de DNA, con una cápside icosaédrica que contiene 162 capsómeros. (Figura 2)

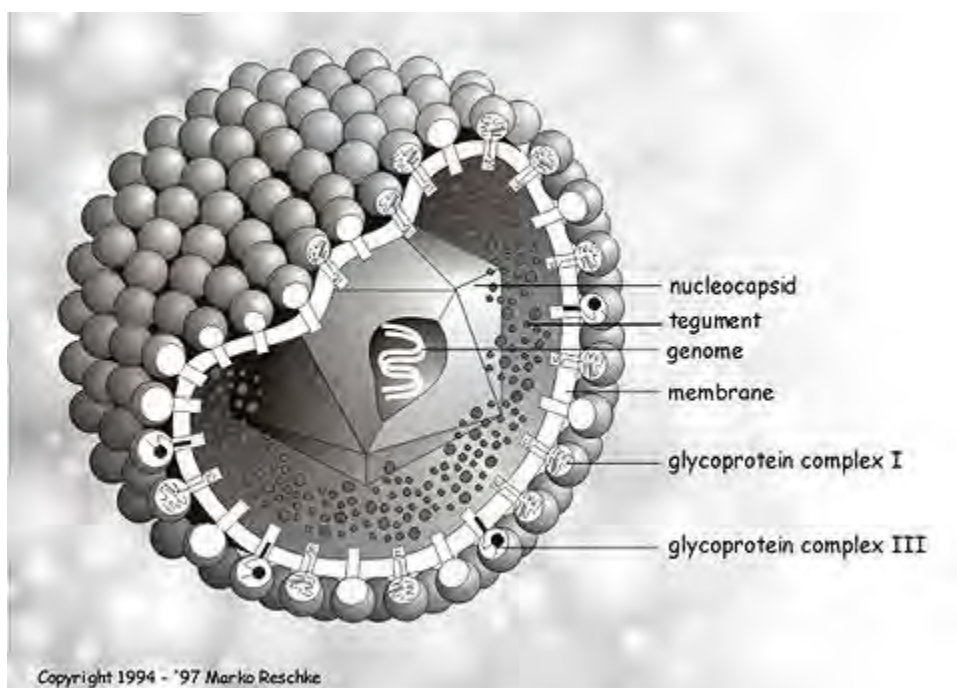


Figura 2 .- Estructura general del Herpes Virus. (tomado de http://web.njit.edu/~pkb3/herpesvirus_biographix.jpg , 29/10/2008 ; 22:10)⁽²⁵⁾

La infección del HSV en los recién nacidos es la consecuencia de que la madre tenga herpes genital. El riesgo de contagio es del 30% al 50%, comparado con el 1% en i nfantes nacidos de mujeres con H SV r ecurrente al momento del nacimiento. Las infecciones en piel, ojos y boca no suelen ser fatales, pero una infección diseminada al sistema nervioso central (SNC) presenta un índice de mortalidad de l 80% e n ause ncia d e t erapia, y muchos de l os i nfantes que sobreviven pueden tener secuelas neurológicas. El HSV neonatal es un padecimiento r elativamente r aro, co n un a est imación de 50 0 a 2500 c asos anuales en Estado Unidos. Una de sus característica es mantener un estado de latencia después de la infección primaria.^(26 - 28)

Aunque existe poca información sobre la actividad neutralizante de la leche contra virus, existen estudios en los cuales se ha descubierto que diferentes proteínas presentes en la leche (β -lactoglobulina, apo-lactoferrina y Fe^{3+} -lactoferrina) inhibe la replicación del rotavirus ⁽²⁹⁾.

Por lo que la finalidad de esta investigación fue la de determinar la actividad neutralizante de la leche materna de mujeres con mastitis subclínica, en contra del HSV-1.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A diferencia de la mastitis clínica, la mastitis subclínica no muestra signos ni síntomas, sólo los niveles de Na/K o IL-8 elevados que nos pueden poner de manifiesto la presencia de este padecimiento. Aunque la leche materna es considerada como un alimento también tiene una actividad protectora para el recién nacido contra los gérmenes del medio ambiente tales como: rotavirus, enterovirus, enterobacterias etc. A pesar de lo anterior la leche materna también se ha asociado como un factor de riesgo para la adquisición de infecciones virales como virus de la inmunodeficiencia humana y virus herpes simple (HSV por sus siglas en inglés).

Los reportes en la literatura mencionan que la leche de mujeres con mastitis clínica presentan niveles elevados de anticuerpos lo que podría beneficiar al recién nacido, sin embargo la especificidad de estos anticuerpos hacia diferentes patógenos es desconocida. En el caso de la leche de mujeres con mastitis subclínica se desconoce si hay aumento o disminución en los niveles de anticuerpos así como de su especificidad hacia los diferentes patógenos.

Debido a lo anterior es necesario conocer o evidenciar que la leche de mujeres con mastitis subclínica los niveles de anticuerpos se encuentran aumentados o disminuidos y si estos anticuerpos tienen la capacidad de proteger contra virus como el HSV tipo 1 (HSV-1) que es uno de los patógenos que pueden causar infecciones en el recién nacido.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad neutralizante de la leche materna de mujeres con mastitis subclínica contra el virus herpes simple tipo 1.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Demostrar si la leche de mujeres con mastitis subclínica tiene actividad neutralizante contra el virus herpes simple tipo 1.
- Comprobar si existe una correlación entre los niveles de IL-8 y los niveles de actividad neutralizante contra el virus herpes simple tipo 1 de la leche materna.
- Evaluar si existe correlación entre los niveles de anticuerpos IgA con la actividad neutralizante en contra del virus herpes simple tipo 1 de la leche de mujeres con mastitis subclínica y sin mastitis subclínica.

HIPÓTESIS

Ha: La leche de mujeres con mastitis subclínica presenta baja actividad neutralizante contra el virus herpes simple tipo-1

Ho: La leche de mujeres con mastitis subclínica presenta alta actividad neutralizante contra el virus herpes simple tipo-1

DISEÑO EXPERIMENTAL

- **POBLACION DE ESTUDIO**

Mujeres en etapa de lactancia. Que estuvieron hospitalizadas en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes durante el periodo 2005 -2006. Las mujeres se clasificarán con mastitis o sin mastitis de acuerdo a los datos clínicos que el médico del Instituto Nacional de Perinatología reporte en su expediente.

- **CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION**

Inclusión:

- Mujeres en periodo de lactancia que hayan concebido en el Instituto Nacional de Perinatología y que quieran participar en el estudio.

Exclusión:

- Mujeres que tengan infección detectada de VIH.
- Mujeres que no quisieron participar en el estudio.
- Mujeres que tengan cáncer, enfermedad autoinmune o alergia.
- Mujeres que estén recibiendo antibióticos, o antivirales

Eliminación:

- Mujeres que durante el periodo de lactancia que reciban medicamento (antibiótico, antiinflamatorio, inmunosupresores, hormonas).
- Mujeres que desarrollen una mastitis clínica durante el estudio.

-
- Mujeres que durante el periodo de lactancia desarrollen enfermedades infecto-contagiosas

Variables que afectan la detección de la actividad neutralizante de la leche contra el virus herpes simple tipo-1

Calidad en la toma de muestra.

Estado de conservación de la muestra.

Manejo adecuado de los cultivos celulares.

Estado de salud de la paciente.

MATERIAL

Material biológico:

- Células VERO (ATCC CCL-81)
- Virus del Herpes Simple tipo I, HSV- I (ATCC VR-1545)
- Muestras de leche materna (de 49 pacientes de ambos pechos)

Material de laboratorio

- Pipetas estériles desechables (FALCON)
- Tubos de cónicos estériles de 15 mL (FALCON)
- Placas estériles de 96 pozos (FALCON)
- Filtros tipo “pirinola”, de 0.20 μ poro (FALCON)
- Puntas estériles para pipeta automática de 20-200 μ L (FALCON)

Equipo

- Lector de placas de ELISA CERES 900 HD (Bio-Tek Instruments, Inc.)
- Incubadora Water-Jacketed CO₂ Incubator (Bellco Biotechnology)
- Incubadora V.I.P. CO₂ Incubator 417 (Lab-Line instruments Inc.)
- Microscopio óptico (Carl Zeiss)
- Campana de flujo laminar (Veco)
- Pipeteador automático (Pipet-Aid, Drumond scientific Co.)
- Pipeta de repetición (Stepper 411, Socorex)
- Cámara de Neubauer (Superior)
- Microcentrífuga (Eppendorf)
- Centrífuga (HN-SII, Internacional Company)

Reactivos

- Solución de Hank´s (GIBCO)
- Tripsina (GIBCO)
- Medio M199 (GIBCO)
- Suero Fetal de Ternera (GIBCO)
- Azul Tripano (MERK)
- Metanol (Merk)
- Cristal Violeta (Sigma)
- Ácido acético glacial (Merk)
- NaCl (Hylel)
- KCl (J.T. Baker)
- KH₂PO₄ (J.T. Baker)
- Na₂HPO₄ (Sigma)

MÉTODOS

Preparación de Células

Se utilizó una botella con crecimiento al 100% de células VERO, y se procedió de la siguiente manera, se extrajo el medio de crecimiento con una pipeta Pasteur estéril, sin tocar la pared de la botella en la que las células estaban adheridas, a continuación se les agregó 5 mL de solución Hank's a la botella para lavar las células, se retiró el Hank's (sin tocar la pared de la botella en la que las células estaban adheridas), y se agregaron 2.5 mL de Tripsina (concentración 1:10 en agua bidestilada esteril), se agitó suavemente la botella, y se chequeó en el microscopio hasta que se inició la separación de las células (la pared en la que las células están adheridas, se notó opaca) se retiró la tripsina (sin tocar la pared de la botella), y se agregaron 2.5 mL de medio M199 5%, se golpeó la botella (para desprender las células de la pared, el medio se notó más turbio), se adicionaron otros 2.5 mL de medio M199 al 5%. Para contar las células, se tomaron 10 μ L de suspensión celular, y se mezclaron con 90 μ L de azul tripano, se colocaron en una cámara de Neubauer, contando las células viables (las cuales se ven claras, las que se ven azules están muertas) en los cuatro cuadros externos, el número total de células se dividió entre cuatro, y se multiplicó por 100,000, este es el número de células presentes por mL. Se ajustó el número de células a 20,000 por cada 100 μ L de suspensión celular.

Titulación del HSV Tipo 1 por el Método de Dosis Infeccivas para Cultivo de Tejidos al 50% (DICT₅₀)

Se prepararon diluciones decimales del virus HSV-1, desde 10^{-1} hasta 10^{-8} , utilizando como diluyente medio M 199 al 2%, se tomaron 100 μ L de cada dilución y se depositaron en una microplaca de 96 pozos, también se incluyó control negativo (el cual consistió solamente de células no infectadas), y control positivo (células infectadas con el virus sin diluir), a cada pozo se le agregaron 100 μ L de suspensión celular (la cual se ajustó 20,000 por cada 100 μ L de suspensión celular) a continuación se incubó la microplaca a 37 °C en atmósfera de humedad con 5% de CO₂, la placa se observó a las 48 horas anotando los pozos en los que hay infección de las células, para calcular el título del virus se utilizó el método de Reed y Muench.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	C-	C+		
B	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	C-	C+		
C	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	C-	C+		
D	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	C-	C+		
E	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	C-	C+		
F	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	C-	C+		
G	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	C-	C+		
H	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	C-	C+		

C- = Control Negativo

C+ = Control Positivo

Preparación de las Muestras

Las muestras de leche se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos, y se filtraron con una membrana de 0.22 μm , se hicieron diluciones de estos filtrados de 1:4, utilizando como diluyente medio M 199 al 2%. Estas se guardaron en refrigeración hasta su uso.

Infección de las Células

Se prepararon 2 microplacas de 96 pozos de la siguiente manera

	1-3	4-6	7-9	10-12		1-3	4-6	7-9	10-12
A	Control (-)	Muestra 5	Muestra 13	Muestra 21	A	Muestra 29	Muestra 37	Muestra 45	Vacío
B	Control (-)	Muestra 6	Muestra 14	Muestra 22	B	Muestra 30	Muestra 38	Muestra 46	Vacío
C	Control (+)	Muestra 7	Muestra 15	Muestra 23	C	Muestra 31	Muestra 39	Muestra 47	Vacío
D	Control (+)	Muestra 8	Muestra 16	Muestra 24	D	Muestra 32	Muestra 40	Muestra 48	Vacío
E	Muestra 1	Muestra 9	Muestra 17	Muestra 25	E	Muestra 33	Muestra 41	Muestra 49	Vacío
F	Muestra 2	Muestra 10	Muestra 18	Muestra 26	F	Muestra 34	Muestra 42	Vacío	Vacío
G	Muestra 3	Muestra 11	Muestra 19	Muestra 27	G	Muestra 35	Muestra 43	Vacío	Vacío
H	Muestra 4	Muestra 12	Muestra 20	Muestra 28	H	Muestra 36	Muestra 44	Vacío	Vacío

Se agregaron 50 μL de la dilución de leche a los pozos donde van las muestras (de acorde al número de muestra) por triplicado, al control positivo se le agregaron 50 μL de medio de M 199 2%, y al control negativo se le agregaron 100 μL de medio de M 199 2%, a continuación se agregaron 50 μL del virus diluido (a una concentración de 200 DICT₅₀) a los pozos correspondientes a las muestras, y la microplaca se incubó durante 1 hora a 37 °C en atmósfera de humedad con 5% de CO₂ con agitación cada 15 minutos. Transcurrida la hora, se agregaron 100 μL de células VERO ajustadas a 20,000 células por cada 100 μL , y nuevamente se incubó durante 24 horas a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂.

Observación del daño celular

Después de 24 horas de incubación, se checó la microplaca en el microscopio óptico y se observó el daño celular en cada pozo, las células dañadas y/o infectadas tienen una apariencia redonda y globosa. (Figuras 3 – 5).

Cuantificación del daño celular

Se desechó el sobrenadante de la microplaca y se depositaron a cada pozo 100 μ L de metanol, se incubó por 7 minutos, se desechó el metanol, y se agregaron 50 μ L de cristal violeta al 2% (evitando que el colorante se escurra por las paredes de los pozos), se incubó la microplaca a 37 °C por 10 minutos, transcurrida la incubación se lavó 5 veces la microplaca adicionando a cada pozo 200 μ L de PBS. Después de los lavados se agregaron 100 μ L de ácido acético glacial al 33% a cada pozo, y se leyó la microplaca en el espectro a 620 nm.

Para obtener el porcentaje de la actividad citolítica de la leche se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ Actividad Citolítica} = \frac{\text{Abs}_{620} \text{ del problema} \times 100}{\text{Abs}_{620} \text{ del control positivo}}$$

Y para calcular el porcentaje de la actividad neutralizante se utilizó:

$$\% \text{ de Neutralización} = 100 - \% \text{ Actividad citolítica}$$

Observación del daño celular

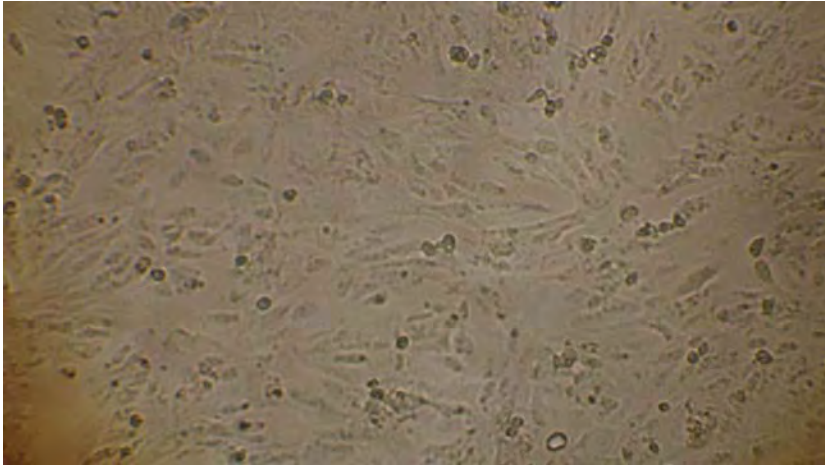


Figura 3. - Células VERO no infectadas.

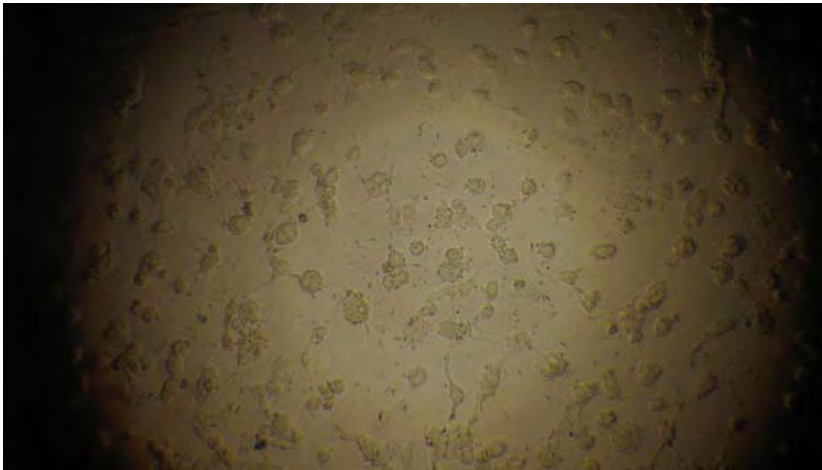


Figura .- Células VERO infectadas

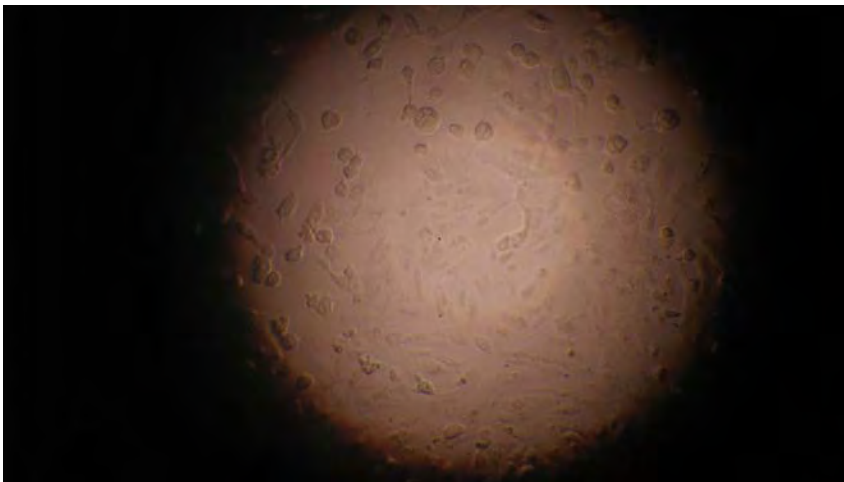


Figura 5.- Células VERO protegidas

Técnica Para la cuantificación de IgA (por inmunodifusión radial, RID por sus siglas en ingles, utilizando el kit NL BLINDARID SUBCLASES IgA HUMANA, Código de Producto: RK015)

El método se basa en el reconocimiento de la IgA por un anticuerpo de conejo anti IgA Humana embebido en un gel. El método consiste en aplica 5 μ L de la muestra en cada pozo, se debe cerrar la tapa de la placa e incubar esta a temperatura ambiente (20 – 24 °C). (Bajo ninguna circunstancia se puede secar el gel durante la incubación). La incubación mínima es de 24 horas, para la difusión completa es de 96 horas. La temperatura influye en el diámetro del halo final, por lo que debe evitarse temperaturas extremas. Incubando a una temperatura de 20-24 °C el diámetro del calibrador sin diluir para IgA1 es de 9 mm (\pm 0,3mm) y para el diámetro del calibrador sin diluir para IgA2 es de 8,0 mm (\pm 0,3 mm). Evitar temperaturas extremas. Para conocer la concentración de Inmunoglobulinas dirigirse a la tabla de referencias.

Técnica para la cuantificación de IL-8 (utilizando el kit IL-8 ELISA, IBL Hamburg, REF BE53081).

Antes de usar los reactivos se mezclaron sin hacer espuma. Cada micropozo se lavó dos veces con 300 μ L del buffer de lavado por pozo. Después del último lavado, se secaron perfectamente los pozos con papel absorbente para remover el exceso del buffer de lavado. Se le agregó 100 μ L del diluyente de la muestra, por duplicado, a todos los pozos estándar. Se prepararon diluciones del estándar pipeteando 100 μ L de IL-8/NAP-1 Standard (2000 pg/mL), por

duplicado en los pozos A1 y A2 (figura 6) se mezcló el contenido y se transfirió 100 μ L al los pozos B1 y B2 respectivamente. Se continuó este proceso 5 veces, para crear dos filas de dilución estándar de IL-8/NAP-1 con rangos de 1000 a 16 pg/mL. Se descartó 100 μ L del último micropozo usado (G1,G2).

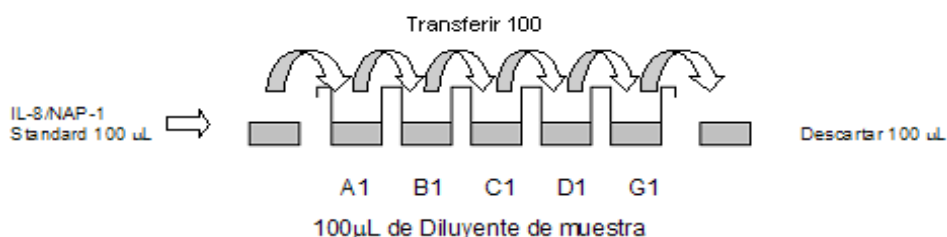


Figura 6.- Preparación de las diluciones estándar de IL-8/NAP-1.

Posteriormente se agregó 100 μ L de diluyente de muestras, por duplicado en los pozos destinados para el blanco y 50 μ L del diluyente para las muestras en los pozos designados para las muestras (Figura 7). Se agregaron 50 μ L de cada muestra, por duplicado, en los pozos designados y se mezcló el contenido.

	1	2	3	4
A	Estándar 1 (1000 pg/mL)	Estándar 1 (1000 pg/mL)	Muestra 1	Muestra 1
B	Estándar 2 (500 pg/mL)	Estándar 2 (500 pg/mL)	Muestra 2	Muestra 2
C	Estándar 3 (250 pg/mL)	Estándar 3 (250 pg/mL)	Muestra 3	Muestra 3
D	Estándar 4 (125 pg/mL)	Estándar 4 (125 pg/mL)	Muestra 4	Muestra 4
E	Estándar 5 (63 pg/mL)	Estándar 5 (63 pg/mL)	Muestra 5	Muestra 5
F	Estándar 6 (32 pg/mL)	Estándar 6 (32 pg/mL)	Muestra 6	Muestra 6
G	Estándar 7 (16 pg/mL)	Estándar 7 (16 pg/mL)	Muestra 7	Muestra 7
H	Blanco	Blanco	Muestra 8	Muestra 8

Figura 7.- Acomodo final de la microplaca.

Se preparó el conjugado – peroxidása (HRP-Conjugate), y se adicionó 50 μ L de esta solución a cada pozo, incluyendo a los pozos blanco. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) por 2 horas. Finalizado el tiempo de incubación, se preparó la solución de sustrato TMB. La microplaca se lavó 3 veces como se describió anteriormente.

Se depositaron 100 μ L de sustrato TMB a todos los pozos (incluidos los blancos), y se incubó la microplaca a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) por aproximadamente 10 minutos, y se agitó a 100 rpm. Se evitó la exposición directa de la placa a fuentes de luz intensa. El color desarrollado en la placa se monitoreó y la reacción se paró mediante la adición de 100 μ L de ácido sulfúrico 8N. La microplaca se leyó en un lector de ELISA a 610 nm.

- **Los valores de IgA e IL-8, fueron proporcionados por la Dr. Marcela López Hurtado, Investigadora del Laboratorio de Virología, del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes”, los cuales forman parte del protocolo de investigación intitulado “Prevalencia de mastitis clínica y subclínica”, con registro 212250 – 08211, perteneciente a dicho organismo.**

- **DISEÑO ESTADÍSTICO**

Los resultados se evaluaron mediante la prueba de Fisher para valores no paramétricos, y la prueba T de student para valores paramétricos.

Titulación del HSV Tipo 1 por el Método de Dosis Infeccivas para Cultivo de Tejidos al 50% (DICT₅₀)

La fórmula para calcular el DICT₅₀ por el método de Reed y Muench es la siguiente:

$$\log \text{DICT}_{50} = \log \text{dil } \frac{\downarrow 50\% - (50 - \% \downarrow 50\%)}{(\% \uparrow 50\% - \% \downarrow 50\%)} \quad \times \log \text{FD}$$

Donde:

dil ↓ 50% = Dilución menor del 50% de infección

dil % ↓ 50% = Porcentaje de la dilución menor del 50% de infección

dil % ↑ 50% = Porcentaje de la dilución mayor del 50% de infección

FD = Factor de Dilución

Los resultados obtenidos de la titulación del virus se muestran a continuación:

Diluciones	# Pozos infectados	# Pozos no infectados	Acumulados infectados	Acumulados no infectados	Proporción Infectados total	% de Infección
10 ⁻¹	8	0	40	0	40/40	100
10 ⁻²	8	0	32	0	32/32	100
10 ⁻³	8	0	24	0	24/24	100
10 ⁻⁴	7	1	16	1	16/17	93.75
10 ⁻⁵	5	3	9	4	9/13	60
10 ⁻⁶	3	5	4	9	4/13	30.76
10 ⁻⁷	1	7	1	16	1/17	5.88
10 ⁻⁸	0	8	0	24	0/24	0

$$\log \text{DICT}_{50} = \log 10^{-6} - \frac{(50 - 30.76)}{(60 - 30.76)} \quad \times \log 10$$

$$\log \text{DICT}_{50} = 6 - \frac{(19.24)}{(29.24)} \times 1$$

$$\log \text{DICT}_{50} = 6 - (0.658) \times 1$$

$$\log \text{DICT}_{50} = \mathbf{5.342}$$

$$1 \text{ DICT}_{50} = 10^{-5.342} \text{ EN } 1 \text{ mL, por lo tanto en } 0.1 \text{ mL } 10^{-6.342}$$

$$\text{anti log } 10^{-6.342} = 2 \text{ 197 859.8 DICT}_{50} / \text{ mL}$$

Para obtener una dilución de 2000 DICT₅₀ / 0.1 mL, se requiere hacer una dilución 1:1098.9

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Debido a la gran variabilidad de los niveles de IL-8 e IgA, como se muestra en las figuras 8 y 9, se decidió analizar estos valores mediante los percentiles 25, 50 y 75 de ambos parámetros. Los resultados se muestran en la tabla 2. En la percentila 25 de las leches tanto del seno derecho como izquierdo los valores promedio de IL-8 fueron de 51.75 y 49.8 pg/mL, respectivamente. Para la percentila 50 fueron 79 y 95.5 pg/mL, y finalmente para la percentila 75 fueron 231.75 y 229.5 pg/mL respectivamente para pecho derecho e izquierdo.

En cuanto a los valores de IgA observamos que la percentila 25 de las leches los niveles fueron de 605 mg/L para ambos pechos, para la percentila 50 de las leches los niveles de IgA fueron de 865 y 610 mg/L para pecho derecho e izquierdo respectivamente y finalmente para la percentila 75 de las leches fueron de 1030 mg/L para ambos pechos.

TABLA 2. NIVELES DE IL-8 E IgA DE LECHE MATERNA EN LOS PERCENTILES 25, 50 Y 75.

	<i>MAMA DERECHA</i>			<i>MAMA IZQUIERDA</i>		
	25%	50%	75%	25%	50%	75%
IL-8 (pg/mL)	51.75	79	231.75	49.8	95.5	229.5
IgA (mg/L)	605	865	1030	605	610	1030

FIGURA 8.- Niveles de IL 8 en leche humana.

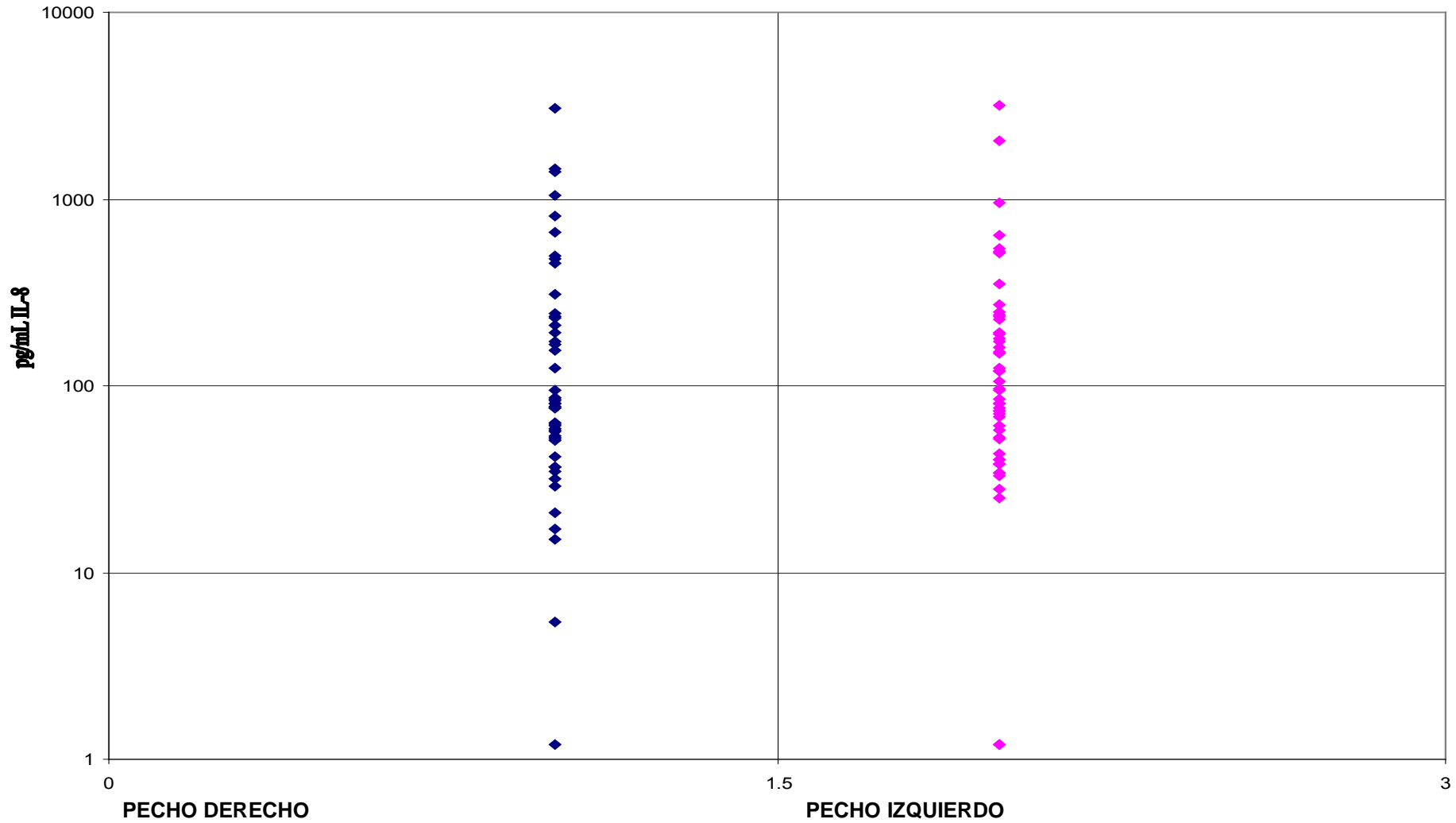
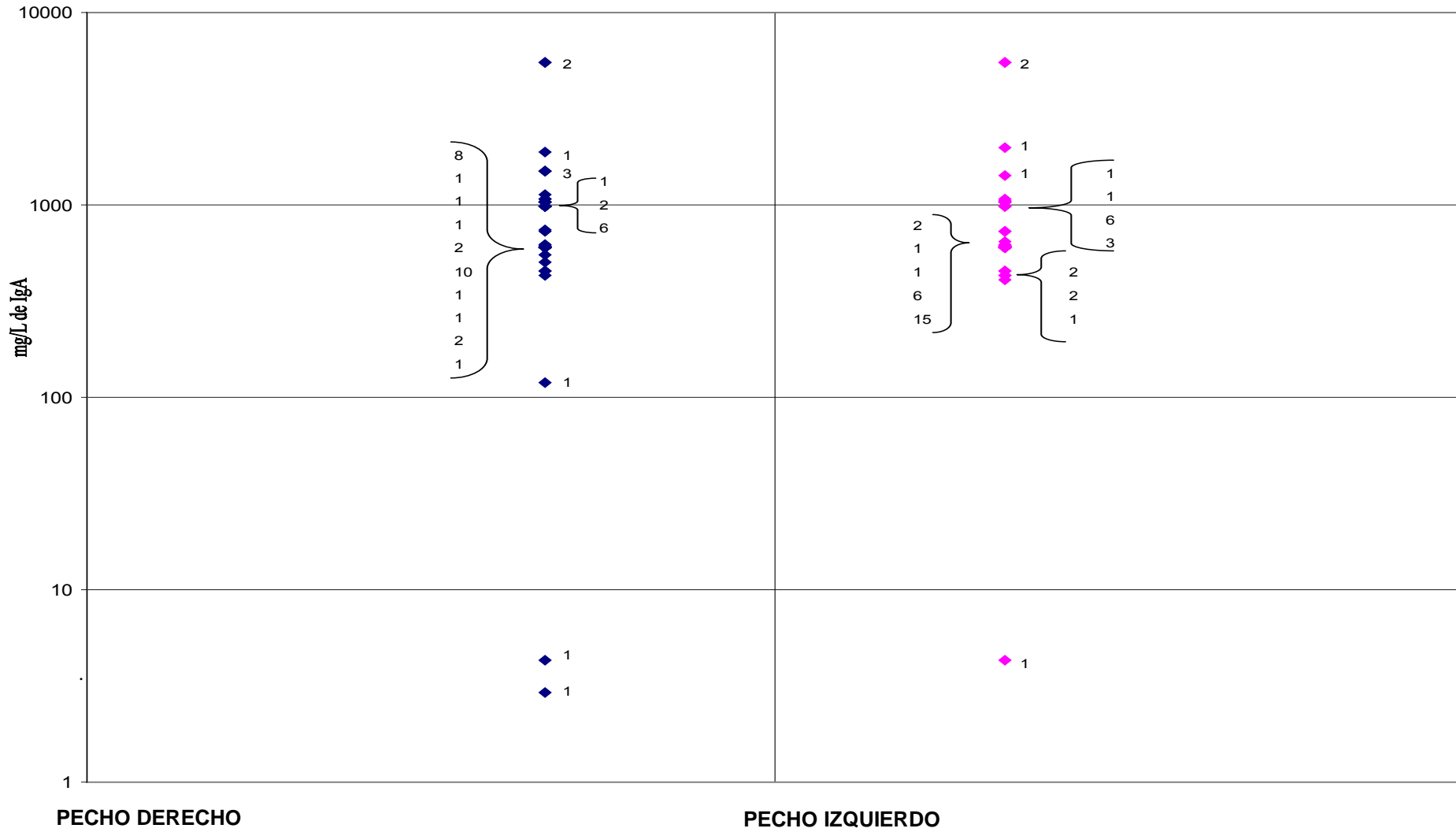


FIGURA 9.- Niveles de IgA en leche humana.



Los valores numéricos representan el número de repeticiones

Detección de IL-8 como indicador de mastitis subclínica

En la tabla 3 se muestra los niveles promedio de IL-8 e IgA, así como el porcentaje de neutralización de la leche de mujeres con y sin dolor de la glándula mamaria, los resultados mostraron que la leche proveniente de pechos sin dolor presentan niveles de IL-8 mayores que la leche de senos que muestran dolor, mientras que los pechos con dolor muestran niveles más elevados de IgA que los que no presentan dolor. Por otra parte, el porcentaje de neutralización de la leche de pechos con dolor y sin dolor no presenta diferencia significativa en los porcentajes promedio.

TABLA 3. NIVELES DE IL-8, IgA Y DE ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE LECHE DE MUJERES CON DOLOR EN MAMAS.

	<i>MAMA DERECHA</i>		<i>MAMA IZQUIERDA</i>	
	DOLOR n = 16	SIN DOLOR n = 33	DOLOR n = 22	SIN DOLOR N = 27
IL-8 (pg/mL)	160.83 ± 50.52 ^a	333.41 ± 107.77 ^a	158.90 ± 29.17 ^a	332.69 ± 135.55 ^a
IgA (mg/L)	1060.14 ± 330.75	1006.37 ± 171.43	1014.21 ± 253.95	898.84 ± 197.38
% N	66.06 ± 4.11	70.67 ± 2.8	70.54 ± 3.47	66.92 ± 2.48

^a = Media y error estándar

%N = Porcentaje de neutralización, que es la actividad de la leche para inhibir la infección por el Virus de Herpes Simple Tipo I (HSV-I)

De acuerdo a los valores de los percentiles 25, 50 y 75 de IL-8 se analizaron las concentraciones de IgA, y el porcentaje de la actividad neutralizante de la leche. En la Tabla 4 se muestran los valores de estos porcentajes. En el caso de IgA, para el percentil 25 se observó una media para pecho derecho de 875.441 con un error estándar de 87.67 mg/L para el percentil 50 presentó un valor de media de 974.18 con un error estándar de 207.24 mg/L y para el percentil 75 mostró una media de 1034.39 con un error estándar de 193.81 mg/L, para el percentil 25 del pecho izquierdo se observó una media de 1110.02 con error estándar de 414.86 mg/L, para el percentil 50 una media de 1122.92 con un error estándar de 282.55 mg/L, y para el percentil 75 una media de 1001.58 con un error estándar de 196.09 mg/L. En el caso del porcentaje de neutralización, en el percentil 25 del pecho derecho se evidenció una media de 67.41 con un error estándar de 3.86%, en el percentil 50 una media de 67.12 con un error estándar de 2.74% y en el percentil 75 una media de 70.5 con un error estándar de 2.43, mientras que en el pecho izquierdo, en el percentil 25 mostró una media de 64.03 con un error estándar de 3.55, en el percentil 50 una media de 71.18 con error estándar de 2.66, y en el percentil 75 una media de 69.37 con un error estándar de 2.23.

TABLA 4. NIVELES DE IgA, Y DE ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE LA LECHE MATERNA ACORDE A LAS PERCENTILES 25, 50 Y 75 DE IL-8 EN LECHE MATERNA.

	<i>Percentiles de IL-8 de la mama derecha (pg/mL)</i>			<i>Percentiles de IL-8 de la mama izquierda (pg/mL)</i>		
	51.75 (pg/mL)^a 25 %	79 (pg/mL) 50%	231.75 (pg/mL) 75%	49.8 (pg/mL) 25%	95.5 (pg/mL) 50%	229.5 (pg/mL) 75%
IgA (mg/L)	875.441 ± 87.67 ^b	974.18 ± 207.24	1034.39 ± 193.81	1110.02 ± 414.86	1122.92 ± 282.55	1001.58 ± 196.09
% N	67.41 ± 3.86	67.12 ± 2.74	70.5 ± 2.43	64.03 ± 3.55	71.18 ± 2.66	69.37 ± 2.23

^a = Valores expresados en los percentiles.

^b = Valores de media y error estándar.

%N = Porcentaje de neutralización, que es la actividad de la leche para inhibir la infección por el Virus de Herpes Simple Tipo I (HSV-I)

De acuerdo a los valores de los percentiles 25, 50 y 75 de IgA se analizaron las concentraciones de IL-8, y el porcentaje de la actividad neutralizante de la leche. En la Tabla 5 se muestran los valores de estos porcentajes. En el caso de IL-8, para el percentil 25 se observó una media para pecho derecho de 229.03 con un error estándar de 119.08 pg/mL para el percentil 50 el valor de la media fue de 274.77 con un error estándar de 135.28 pg/mL y para el percentil 75 se observó una media de 240.8 con un error estándar de 101.41 pg/mL, para el percentil 25 del pecho izquierdo se observó una media de 219.68 con error estándar de 147.96 pg/mL, para el percentil 50 la media fue de 310.81 con un error estándar de 149.73 pg/mL, y para el percentil 75 una media de 308.29 con un error estándar de 107.53 pg/mL. En el caso del porcentaje de neutralización, en el percentil 25 del pecho derecho se observó una media de 62 con un error estándar de 5.42%, en el percentil 50 una media de 67.8 con un error estándar de 3.23% y en el percentil 75 una media de 63.85 con un error estándar de 2.88%, con significancia estadística ($p < 0.002$) con respecto al pecho izquierdo, mientras que en el pecho izquierdo, en el percentil 25 se observó una media de 65.81 con un error estándar de 4.42%, en el percentil 50 una media de 70.21 con error estándar de 2.55%, y en el percentil 75 una media de 68.26 con un error estándar de 2.33%.

TABLA 5. NIVELES DE IL-8 Y DE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE LA LECHE MATERNA ACORDE A LAS PERCENTILES 25, 50 Y 75 DE IgA EN LECHE MATERNA.

	<i>Percentiles de IgA de la mama derecha (mg/L)</i>			<i>Percentiles de IgA de la mama izquierda (mg/L)</i>		
	605 (mg/L)^a 25%	865 (mg/L) 50%	1030 (mg/L) 75%	605 (mg/L) 25%	610 (mg/L) 50%	1030 (mg/L) 75%
IL-8 (pg/mL)	229.03 ± 119.08 ^b	274.77 ± 135.28	240.8 ± 101.41	219.68 ± 147.96	310.81 ± 149.73	308.29 ± 107.53
% N	62 ± 5.42	67.8 ± 3.23	63.85 ± 2.88*	65.81 ± 4.42	70.21 ± 2.55	68.26 ± 2.33

^a = Valores expresados en los percentiles.

^b = Valores de media y error estándar.

%N = Porcentaje de neutralización, que es la actividad de la leche para inhibir la infección por el Virus de Herpes Simple Tipo I (HSV-I)

* = p < 0.002

DISCUSIÓN

En esta investigación los niveles de IL-8 de leches de madres sin mastitis clínica (corroborada de acuerdo a sus niveles de IL-8) mostró que el 74% de las madres presentaban niveles mayores de 63 pg/mL niveles IL-8 que son considerados como valores que presentan las mujeres con mastitis clínica (valores de 63 a 2000 pg/mL) ⁽⁷⁾. A pesar de lo anterior, los senos de estas mujeres no mostraron ningún otro signo clínico para considerar que sufrieran de una mastitis clínica, excepto el dolor que lo presentó el 48% de las mujeres analizadas, aunque este dolor fue leve. De estas mujeres el 4.35% sufrían de dolor en pecho derecho, 30.44% dolor en el pecho izquierdo y 65.21% dolor en ambos pechos.

Al comparar los niveles de IL-8 e IgA de pechos con dolor y sin dolor, se observó que los niveles de IgA se encontraban elevados en aquellos senos que mostraron dolor y que los niveles obtenidos de IL-8 eran mayores en los senos sin dolor.

Debido a la gran variabilidad de los datos de IL-8 e IgA obtenidos en este estudio y que no reflejan una verdadera mastitis, se optó a analizar los valores por percentiles al 25%, 50% y 75% para conocer los valores de estas moléculas en las mujeres estudiadas. El 75% de la población no mostró evidencias de inflamación (el rango del 25% fue de 11.803 a 41.973 pg/mL y el del 50% de 53.862 a 73.104 pg/mL de IL-8) sólo el 25% presentó inflamación

(80.899 a 190.863 pg/dL). Para pecho izquierdo los rangos fueron en el 25% de la población de 15.402 a 43.868 pg/mL; para el 50% de 58.538 a 84.154 pg/mL y finalmente para el 75% de 113.713 – 191.363 pg/mL de IL-8. Como se puede observar el 75% de la población femenina estudiada mostró niveles mayores de IL-8 en su leche a los reportados para la leche normal.

En cuanto a los rangos de IgA del pecho derecho estos fueron de 265.795 a 686.675 mg/L para el 25%, 595.142 a 728.858 mg/L para el 50% y de 986.6 a 1027.684 mg/L para el 75%, y para el pecho izquierdo de 392.613 a 678.367 mg/L para el 25%, 610 mg/L para el 50% y 750.061 a 1077.631 mg/L para el 75%.

Al realizar la asociación entre los niveles de IL-8 de la leches con su actividad antiviral se observó que no existe ninguna asociación mientras que al analizar los niveles de IgA de la leche con su actividad antiviral se observó que el 75% de las leches con valores menores a 1030 mg/L no tienen actividad neutralizante contra el HSV-1, a diferencia del 25% de las leches con valores mayores o iguales a 1030 mg/L que mostraron una actividad neutralizante del 75% contra el HSV-1.

En esta investigación al parecer los anticuerpos IgA participan de manera importante para la neutralización de virus HSV-1 ya que sólo niveles mayores de 890.627 mg/L tuvieron esta actividad.

CONCLUSIONES

- El 75% de las leches maternas tuvieron actividad neutralizante en contra del HSV 1
- El 75% de las leches maternas analizadas en este estudio mostraron niveles de IL-8 mayores a 64 pg/mL, niveles reportados como positivos para mastitis clínica.
- No existe correlación entre niveles altos o bajos de IL-8 con la actividad neutralizante de la leche en contra del HSV-1
- El 25% de las leches maternas que mostraron mayor actividad neutralizante en contra el Virus HSV-1, tuvieron niveles de IgA mayores de 1030 mg/L.
- La IgA de la leche materna de mujeres con mastitis subclínica tuvieron actividad neutralizante contra el HSV-1.

REFERENCIAS

- 1.- Mastitis causas y manejo. Organización mundial de la salud 2000, http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_FCH_CAH_00.13_spa.pdf (12/03/08 11:23)
- 2.- Michie C, Lockie F And Lynn W. The challenge of mastitis. Arch. Dis. Child. 2003; 88; 818-821
- 3.- http://www.medela.cl/breastfeeding/img/bre_breast_detail_web_sp_l.jpg (17/10/2008 14:22)
- 4.- Van De Perre P. Transfer of antibody via mother`s milk. Vaccine, 2003; 21; 3374-3376. |
- 5.- Newman jack, H ow br eastmilk pr otecs newborns. <http://www.breastfeedingonline.com> (10/02/08 20:23)
- 6.- Field C. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. J. Nutr. 2005; 135; 1-4,
- 7.- Semba, R D , Kumwenda N, Taha, T E , Hoover D R , La nY, E isinger W, Mtimavalye L, Broadhead R, Miotti P G, Van Der Hoeven L, And Chipangwi J D. Mastitis and immunological factors in breast milk of lactating women in Malawi. Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6; 671-674,
- 8.- Lindberg E , N owrouzian F , Adlerberth I. Long-time persistence of superantigen-producing *staphylococcus aureus* strains in the intestinal microflora of healthy infants. Pediatr Res 2000; 48; 741-7.
- 9.- Steve K, Lian S. The relative role of transplacental and milk immune transfer in protection against lethal neonatal herpes virus infection in mice. J Infect Dis 1984; 143; 38- 42
- 10.- Feldman E. (Editor) Nutricion pediátrica en Principios de nutrición clínica.; Borowitz D. El Manual Moderno. México 1990. pag 200-207.
- 11.- Margit H. Bioactive factors in human milk. Ped Clin of North Am 2001; 48; 69 -86.
- 12.- Abdulla E, Zaidi F, Zaidi A. Immune factors in breast milk. Pak. J Med Sci. 2005; 21; 178-186
- 13.- Osterman K, Rahm V. Lactation mastitis: bacterial cultivation of breast milk, symptoms, treatment, and outcome. J Hum Lact 2000; 16; 297-302.

- 14.-**Tenhagen B. Do antibacterial milk constituents interfere with microbiological examination of clinical mastitis ? *Acta Vet Scand* 2003; 98 (supple 1); 185; 189
- 15.-** Amir L, Forster D, Lumley J, Mclachlan H. A descriptive study of mastitis in Australian breastfeeding women: incidence and determinants. *BMC Public Health*, 2007 ; 7; 62
- 16.-** Buescher E, Hair P. Human milk anti-inflammatory components contents during acute mastitis. *Cell Immunol*, 2001; 210; 87-95
- 17.-** Lehtolainen T, Røntved C, Pyörälä S. Serum amyloid A and TNF- α in serum and milk during experimental endotoxin mastitis. *Vet. Res.* 2004; 35; 651–659
- 18.-** Newburg D. Innate immunity and human milk. *J. Nutr.* 2005; 135; 1308-1312.
- 19.-** Karem K, Bowen J, Kuklin N, Rouse B. Protective immunity against herpes simplex virus (HSV) type 1 following oral administration or recombinant *salmonella typhimurium* vaccine strains expressing HSV antigens. *J. Gen. Virol.* 1997; 78; 427-434.
- 20.-** Filteau S. Breast milk immune factors in Bangladesh women supplemented postpartum with retinol or β -carotene. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69; 953-958.
- 21.-** Aníbal M. (Editor) Citoquinas en Inmunología e Inmunoquímica: Fundamentos, Álvarez E. Medica Panamericana; Buenos Aires, Argentina 1996; pag 237 – 247
- 22.-** Newburg D. Innate immunity and human milk. *J. Nutr.* 2005; 135; 1308-1312.
- 23.-** Scott M. Herpes simplex virus mastitis: clinical and imaging findings. *Am J Roentgen.* 2000; 174; 1087-1088.
- 24.-** Dunkle L, Schmidt R, O'Connor D. Neonatal herpes simplex infection possibly acquired via maternal breast milk. *Pediatrics* 1979; 63:250–251
- 25.-** http://web.njit.edu/~pkb3/herpesvirus_biographix.jpg , (29/10/2008 ; 22:10)
- 26.-** Brown E, Gardella C, Malm G, Prober C, Forsgren M, Krantz E, Arvin A, Yasukawa L, Mohan K, Brown Z, Corey L, Wald A. Effect of maternal herpes simplex virus (HSV) serostatus HSV type on risk of neonatal herpes. *Acta Obstet Gynecol.* 2007; 86; 523-529.
- 27.-** Brown E, Morrow R, Krantz E, Arvin A, Prober C, Yasukawa L, Corey L, Wald A. Maternal herpes simplex virus antibody avidity and risk of neonatal herpes. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195; 115-120.

28.- Knezevic A, Martic J, Stanojevic M, Jankovic S, Nedeljkovic J, Nikolic L, Pasic S, Jankovic B, Javonovic T. Disseminated neonatal herpes caused by herpes simplex virus types 1 y 2. Emer Infect Dis, 2007; 13 (Supple 2); 302-304

29.- Superti F, Ammendolia M, Valenti P, Seganti L. Antiviral activity of milk proteins : lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line ht-29. Med Microbiol Immunol. 1997; 186; 83–91

30.- Cole A , Pilkington B , McLaughlan J, Smith C , Balsitis M, Hawkey C. Mucosal factors inducing neutrophil movement in ulcerative colitis: the role of interleukin 8 and leukotriene b₄. Gut 1996; 39: 248-254

APENDICE 1

ABREVIATURAS

IgA	Inmunoglobulina A
HSV I	Herpes Simplex Virus Type I
IL8	Interleucina 8
kDa	Kilo Daltons
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
SLPI	Inhibidor de la secreción de la proteasa del leucocito

APENDICE 2

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

PBS 1x

NaCl	8.4 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	2.9 g
H ₂ O Desionizada	1000 mL

Se disuelven las sales en 800 mL de agua desionizada en el orden descrito en un vaso de precipitados, se ajusta el pH final de la solución a 7.2, y se lleva a 1000 mL en un matraz volumétrico.

CRISTAL VIOLETA 2%

Cristal Violeta	2 g
H ₂ O Desionizada	100 mL

Se disuelve el cristal violeta en 40 mL de agua desionizada en un vaso de precipitados, aforar a 100 mL y dejar madurar durante 24 horas, filtrar en papel Whatman # 4 y guardar a temperatura ambiente en un frasco ambar.

APENDICE 3

Tabla de referencias RID

Este método no necesita la confección de una curva de calibración – las concentraciones correspondientes a cada diámetro de halo se leen directamente de la tabla de referencias RID. Para garantizar que se haya alcanzado el tamaño del halo completo la duración de difusión debe ser de como mínimo 96 horas. Para la verificación debe incluirse en cada placa un calibrador sin diluir.

Curva de Calibración a Punto final de la RID

En este método se emplean el calibrador sin diluir además de dos diluciones para confeccionar una curva lineal estándar. Para alcanzar el tamaño del halo total la duración de difusión deberá ser de como mínimo 96 horas. La curva estándar se puede emplear para varias placas de un mismo lote. En este caso deberá ser aplicado en la placa un calibrador sin diluir como control.

Curva de calibración previa a Punto final para RID

En este método se emplean el calibrador sin diluir más las dos diluciones para confeccionar una curva estándar. Esta no es lineal, dado que los diámetros de halo se determinan antes del punto final. La difusión mínima recomendada es de 24 horas.

Debería confeccionarse una curva de calibración para cada placa.

Aplicación de Calibradores y Muestras

Antes de usar, agitar con cuidado el calibrador, el control y las muestras.

Aplicar 5 µl del calibrador sin diluir en un pocillo. En caso de seguir el método DOS o TRES, aplicar también los calibradores diluidos (60% y 10%) en pocillos correspondientes y en el resto de los pocillos 5 µl de muestras y controles convenientemente diluidos.