



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE HORMONAS
REGULADORAS DE LA INGESTA ALIMENTICIA EN
LACTOCITOS DE MUJERES DURANTE LA LACTANCIA**

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

PRESENTA

Xóchitl Nieves Morales

Directora de Tesis

Dra. Maricela Rodríguez Cruz



Los Reyes Iztacala Estado de México, 2017



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.

DEDICATORIAS

A mis padres, Xóchitl María del Carmen Morales Pérez y Sebastián Miguel Nieves López por ser el vínculo de amor incondicional más puro que tengo en mi vida.

Gracias Ma, por tu dedicación, amor, apoyo y bondad en todo momento. Gracias por ser mi Maestra #1 en la vida. Gracias por acompañarme, guiarme, escucharme y darme aliento cuando las cosas se ponen difíciles. Gracias por todos y cada uno de los días de trabajo para poder darnos lo mejor a mis hermanos y a mí. Gracias por ser mi prueba viviente de que el que persevera, alcanza. No existen palabras para describir el profundo amor y agradecimiento que me inspiras. Lo logramos. ¡Te amo!

A mi abuelia Carmelita por ser el pilar de nuestra familia, por tus mil formas de hacernos sonreír, por consentirme tanto y por creer en mí. ¡Te amo!

A mi mamá Liz, por tu amor y apoyo incondicional. Por tus tiernos cuidados, por escucharme, mimarme y alentarme. Gracias por amarme y acompañarme, gracias por los reyes magos de cada año, por el sin fin de aventuras a tu lado. Gracias por hacerme parte de tu vida y tu familia a cada instante, por considerarme durante toda mi vida. ¡Te amo!

A mis hermanos Miguel (Arturo) y Alejandra por cuidarme, procurarme, amarme, apoyarme y acompañarme durante toda mi vida. Gracias Ale por ser como eres, por incluirme en tus momentos de felicidad y tristeza. Gracias por confiar en mí, por las experiencias a tu lado, por los secretos guardados, por las risas y los juegos, por enseñarme la fuerza y bondad de tu Ser. Infinitas gracias por darme el privilegio de ser tía. Arturo, gracias por los juegos compartidos, por compartirme tu forma de ver la vida y

por permitirme tomar una parte de ella que ahora me complementa, gracias por tu apoyo.
¡Los amo!

A mi sobrina, Luna Celeste por alegrarme el alma con su llegada. Gracias hermosa por existir y por elegirnos como tu familia. ¡Te amo profundamente!

A mi tía Susana, por ser el vínculo más bonito y amoroso que tengo con mi papá aquí en la tierra. Por transmitirme la fuerza, la bondad y la alegría de él a través de ti. Por estar para nosotras, por apoyarnos y querernos tanto. ¡Te amamos!

A mi tía Marisol gracias por tus cuidados y los valores inculcados, por darle sabor a mi vida con tu risa contagiosa. A mi tía Angélica por los momentos compartidos. Gracias por alentarme. ¡Las amo!

A mi tío Arturo, por tu amor y por tus ocurrencias que alegran la vida. Por tus consejos y regaños. Por tu perseverancia para salir adelante a cada instante. ¡Te amo!

A mi tío Lalo (Torres), por tu apoyo incondicional, por tu ayuda en todos los sentidos durante los momentos complicados, por tus bromas que amenan todas las situaciones. Por abrirme las puertas de tu casa y hacerme parte de tu familia. Gracias por todas tus muestras de cariño, por ser mi ejemplo de “querer es poder”. ¡Te amo!

A mis primos Itzia, Ivan, Arantza y Angel por estar en mi vida, por animarme, por sus bromas, por las travesuras compartidas, gracias por ser como mis hermanos. Infinitas gracias por compartirme un poquito de ustedes. ¡Los amo!

A mis primos Mariel y Mateo, gracias por llegar a nuestras vidas, por mostrarnos la inocencia y el amor a través de sus juegos, gracias por transmitirme la pasión por la vida. Gracias por alegrar mi existencia con su presencia. ¡Los amo infinitamente!

A mi corazón, Jaime. Por las horas interminables de estudio, por aguantar mis ensayos para cada exposición y por aceptar las ausencias en momentos importantes para ti. Gracias por estar para mí, apoyándome y alentándome; por amarme e inspirarme tantísimos sentimientos bellos. Gracias por llegar a mi vida. ¡Te amo!

A mi amigo, mi hermano Jorge Mendoza y a mi gran amiga Doña Guadalupe, gracias por Ser por Estar, por TODO. Fueron, Son y Serán parte de mi alma todas mis vidas. ¡Los amo y los extraño con todo el corazón!

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, por abrirme sus puertas para continuar mi formación académica y por su ayuda a través de los distintos programas, que nos benefician como estudiantes.

Agradezco a la Dra. Maricela Rodríguez Cruz por su conocimiento, guía, dedicación y tiempo para llevar a cabo este proyecto y por incluirme en su equipo de trabajo.

Agradezco a la M. en C. Judith Villa Morales por su ayuda y consejos brindados durante este tiempo, ¡GRACIAS! Te quiero mucho.

¡MUCHAS GRACIAS! A mis revisores, por su apoyo para llevar a cabo este trabajo:

Dr. Alonso Antonio Vilches Flores

M. en C. Pilar Amellali Badillo Suárez

M. en C. Ismael Herminio Pérez Hernández

M. en C. Alina Uribe García

Con admiración e infinito respeto, gracias a la Maestra Pilar Amellali Badiillo Suárez, por su apoyo INCONDICIONAL, por compartirme sus éxitos, su sabiduría y conocimiento, su vida, su tiempo, su disciplina y paciencia, por ser luz y esperanza para mí y mi familia en los momentos más complicados. Gracias por las pláticas con todos los matices. Gracias por enseñarme a ver la vida desde otra perspectiva. Gracias por sus infinitas muestras de cariño. Gracias por el interés mostrado para cada uno de sus alumnos. Gracias por enseñarme que la vida es igual de importante dentro y fuera del laboratorio. Gracias por

mostrarme su calidez y respeto hacia todo Ser Humano, ¡GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS! ¡La amamos!

Gracias a mis amigas Alejandra Godoy, Thalía Segundo y Daniela Esparza, por las horas de estudios y de desvelo, por las pláticas y los secretos guardados. Gracias por su confianza, por permitirme ayudarlas y acompañarlas durante toda la carrera. Gracias por enseñarme la belleza de su Ser. Las valoro y quiero tantísimo.

Gracias a mis amigos de laboratorio: Ricardo, Rosario y Maricela. Por las risas y lágrimas compartidas, por las pláticas amenas, por sus muestras de cariño para mí y mi familia. Gracias por su ayuda en todo momento, por su complicidad, pero sobre todo por su amistad. ¡Los quiero mucho!

Gracias a cada una de las mujeres que confiaron en nosotros y nos abrieron las puertas de sus casas, para llevar a cabo esta investigación. Gracias por las muestras de agradecimiento, respeto y paciencia hacia nuestro trabajo que con placer llevamos a cabo.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, fue financiado por dicha institución por medio del proyecto **“Composición de la leche durante la lactancia de mujeres con sobrepeso u obesidad: macronutrientes y hormonas que regulan la ingesta de alimentos”** (Registro ante la CNIC del IMSS R-2015-785-045) a través, del programa “Apoyo financiero para el desarrollo de protocolos de investigación y desarrollo tecnológico sobre prioritarios de salud” y por *Kellog’s* a través del programa “Apoyo a proyectos de

investigación en nutrición”. Instituciones a las cuales agradezco profundamente su apoyo. Asimismo, agradezco la beca proporcionada por los fondos del proyecto (R-2015-785-045) durante el desarrollo de la tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	4
1. INTRODUCCIÓN	8
1.2 Glándula mamaria	10
1.3 Morfología de la glándula mamaria	11
1.4 Fisiología de la glándula mamaria	12
1.5 Lactancia	14
1.6 Tipos de Leche Materna	15
1.7 Componentes de la leche	17
1.7.1 Macronutrientes y Micronutrientes	17
1.7.2 Hormonas	17
1.8 Regulación de la ingesta de alimentos	18
1.8.1 Mecanismo del apetito	18
1.8.2 Hormonas orexigénicas	20
1.8.3 Hormonas anorexigénicas	21
1.8.4 Hormonas con ambas funciones.....	22
2. ANTECEDENTES	24
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
5. OBJETIVOS	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1 Diseño de estudio	34
6.2 Población de estudio.....	34
6.3 Aspectos éticos.....	34
6.4 Variables de estudio.....	35
6.5 Criterios.....	35
6.7.1 Trabajo de campo	36
6.7.2 Trabajo de laboratorio	36
7. RESULTADOS	42
8. DISCUSIÓN	54
10. BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la leche materna de población rural mexicana.	16
Tabla 2. Secuencia de PRIMERS	40
Tabla 3. Datos demográficos de las participantes.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fisiología y Morfología de la glándula mamaria	11
Figura 2. Etapas de desarrollo de la glándula mamaria.....	13
Figura 3. Secreción láctea	14
Figura 4. Regulación de la ingesta alimenticia.....	20
Figura 5. Integridad del RNA de los tres tipos de leche materna.....	43
Figura 6. Productos de PCR en gel de agarosa al 2%.	45
Figura 7. Curvas de disociación de <i>IGF-1</i>	47
Figura 8. Expresión del transcrito de <i>Caseína</i>	48
Figura 9. Expresión del gen de <i>α-Lactoalbúmina</i>	49
Figura 10. Expresión del gen <i>GHRL</i>	50
Figura 11. Expresión del gen de <i>ADIPOQ</i>	51
Figura 12. Expresión de <i>LEP</i>	52
Figura 13. Expresión del gen <i>IGF-1</i>	53

ABREVIATURAS

ADIPOQ: gen que codifica adiponectina.

AgRP: péptido relacionado con Agouti.

ARC: núcleo arcuato.

CART: transcrito relacionado con cocaína y anfetamina.

Cp: “punto de corte” por sus siglas en inglés *croosing point*.

Cq: “ciclo umbral” por sus siglas en inglés *cycle threshold*.

ELISA: “ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas” por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

FNDC5: gen que codifica irisina.

DMG: diabetes mellitus gestacional.

GHRL: gen que codifica para grelina.

GM: glándula mamaria.

HRI: hormonas que regulan la ingesta de alimentos.

IGF-1: “factor de crecimiento insulínico tipo 1” por sus siglas en inglés “*insulin like growth factor 1*”.

IGF-1: gen que codifica IGF-1.

LEP: gen que codifica para leptina.

LH: leche humana.

mRNA: “ácido ribonucleico mensajero”, por sus siglas en inglés *Messenger RNA*.

NPY: neuropéptido Y.

PCR: “reacción en cadena por la polimerasa” por sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*.

POMC: proopiomelanocorticona.

RETN: gen que codifica para resistina.

RIA: radioinmunoensayo.

q-PCR: “reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real” por sus siglas en inglés *quantitative polymerase chain reaction*.

SNC: sistema nervioso central.

TAB: tejido adiposo blanco.

TGI: tracto gastrointestinal.

RESUMEN

La leche es el alimento más recomendado para el recién nacido, ya que su contenido energético y sus nutrimentos, favorecen el crecimiento y el desarrollo cerebral del neonato. La concentración de los componentes de la leche varía durante la lactancia distinguiéndose así tres tipos de leche: calostro, leche de transición y leche madura, que contienen micro (vitaminas, minerales entre otros) y macronutrimentos (carbohidratos, lípidos y proteínas). Dentro de las proteínas secretadas en la leche se encuentran algunas hormonas que intervienen en la regulación de la ingesta alimenticia: las orexigénicas que promueven la ingesta de alimentos como resistina y grelina y las anorexigénicas que lo inhiben como leptina. Por otro lado, existen hormonas que pueden llevar a cabo ambas funciones: adiponectina, irisina y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1). Las cuales podrían ejercer un efecto programador en el metabolismo del lactante, condicionando su estado de salud nutricio en el futuro. Con el propósito de identificar si la glándula mamaria tiene un papel crucial en la síntesis de estas hormonas, se planteó la realización del presente trabajo con los objetivos de determinar el perfil de expresión génica de las hormonas que regulan la ingesta alimenticia *LEP* (leptina), *RETN* (resistina), *ADIPOQ* (adiponectina), *GHRL* (greina), *FNDC5* (irisina) e *IGF-1* en restos de lactocitos provenientes de la leche materna. Y determinar si existe diferencia en la expresión génica de éstas hormonas en el calostro, leche de transición y leche madura. Este estudio fue de tipo descriptivo, longitudinal y prospectivo. Se incluyeron 15 mujeres en periodo de lactancia. A las cuales se les tomó muestra de los tres tipos de leche para el análisis de la expresión de los genes de interés. En total se extrajeron 45 muestras de RNA total provenientes de los restos de lactocitos obtenidos de los tres tipos de leche. Por lo que se realizó PCR punto final, de los transcritos para identificar si éstos se

expresaban en la glándula mamaria, utilizando al gen *β-actina* como gen de referencia. Para realizar el perfil de expresión génica se realizaron ensayos de PCR en tiempo real. Como resultados se encontró que los transcritos *GHRL*, *LEP*, *ADIPOQ* e *IGF-1* se expresaron en los restos de lactocitos mientras que los genes *RETN* y *FNDC5* no se expresaron. La expresión de los genes de *GHRL*, *LEP* y *ADIPOQ* disminuyó durante el primer mes postparto, no obstante, sólo la expresión de *GRHL* y *ADIPOQ* disminuyó significativamente ($P = 0.01$, y $P = 0.001$) respectivamente. Finalmente, *IGF-1* se mantuvo estable en los tres tiempos ($P = 0.63$) y ($P = 0.22$). Los resultados sugieren que los lactocitos podrían intervenir en la concentración de estas hormonas en leche materna aunada a la fisiología gastrointestinal y endócrina del lactante, participando en mecanismos de programación nutricia.

1. INTRODUCCIÓN

La leche materna es producida en la glándula mamaria por las células secretoras denominadas lactocitos y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015); la leche materna es el alimento más recomendado para el recién nacido, ya que su contenido energético y sus nutrimentos, favorecen el crecimiento y el desarrollo cerebral del neonato. La composición de la leche varía durante la lactancia distinguiéndose así tres tipos de leche: calostro, leche de transición y leche madura, que contienen macronutrimentos (carbohidratos, lípidos y proteínas) y micronutrimentos (minerales y vitaminas). No obstante, son muchos los factores que influyen en la composición y el volumen de la secreción láctea, tales como los factores genéticos, la nutrición materna y la hora del día, entre otros. Sin embargo, la concentración de estos nutrimentos se modifica en respuesta a los requerimientos del infante (Calixto *et al.*, 2011). Dentro de la fracción proteica se encuentran diversas hormonas como: grelina, resistina, leptina, adiponectina, irisina y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), las cuales intervienen en la regulación de la ingesta alimenticia por lo que podrían influir en la programación nutricional y por tanto en la ganancia de peso y talla del neonato (Savino *et al.*, 2009); por ello es imperativo analizar la concentración de éstas en la leche materna. Dentro de las señales orexigénicas se encuentra la grelina, codificada por el gen *GHRL* la cual incrementa la ingesta de alimentos y es producida principalmente en el estómago, aunque se ha propuesto la expresión de este gen en los lactocitos (Savino *et al.*, 2009). Asimismo, la resistina que incrementa la ingesta de alimentos, es codificada por el gen *RETN* y sintetizada por los adipocitos, sin embargo, aún se desconoce si los lactocitos participan en la síntesis de esta hormona (Ilcol *et al.*, 2008). Por otro lado, la

leptina tiene un efecto anorexigénico (inhibe la ingesta de alimentos) y es codificada por el gen *LEP* y secretada principalmente en el tejido adiposo, aunque existen estudios como el publicado por Casabiell y colaboradores en 1997 que sugieren su síntesis en la glándula mamaria. En cuanto a la adiponectina es codificada por el gen *ADIPOQ*, interviene en la regulación del metabolismo energético y es sintetizada por el tejido adiposo blanco, también se ha reportado su expresión en lactocitos (Martin *et al.*, 2006). Respecto a la irisina, ésta se sintetiza en el músculo esquelético y la codifica el gen *FNDC5*, en el embarazo se relaciona con el aumento del tejido adiposo de la madre con el fin de incrementar las reservas energéticas disponibles y además se ha sugerido su expresión en los lactocitos (Çatli *et al.*, 2014). Finalmente, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) es producido principalmente por el hígado, codificado por el gen *IGF-1* y tampoco se ha comprobado si la glándula mamaria tiene un papel importante en su síntesis (Stanley *et al.*, 2014). Dado la presencia de estas moléculas bioactivas en la leche materna, Savino y colaboradores en el 2009 destacaron que éstas podrían tener un efecto protector contra la obesidad, al ejercer un efecto programador en el metabolismo del lactante, condicionando su estado de salud nutricio en el futuro.

Con el propósito de identificar si la glándula mamaria tiene un papel crucial en la síntesis de estas hormonas, influyendo así en el contenido de éstas en la leche materna, condicionando el estado nutricio del lactante en etapas posteriores, se planteó el presente trabajo de investigación.

1.2 Glándula mamaria

La glándula mamaria (GM) es un órgano de origen ectodérmico especializado en la secreción láctea (leche), siendo una característica diacrítica de los mamíferos. Dicha secreción es un fluido biológico complejo que provee los nutrimentos necesarios a las crías durante la primera etapa de vida, siendo un proceso fisiológico que contribuye a la supervivencia de la especie (Oakes *et al.*, 2008). Este órgano se encuentra tanto en machos como en hembras, no obstante, únicamente en las hembras es funcional después de pasar por una serie de procesos para su crecimiento y maduración, alcanzando la maduración morfofisiológica durante el embarazo permitiendo que durante la lactancia se de la producción de leche (Johnson, 2010).

La GM es de tipo exocrina y su secreción es **apocrina**, por lo que se presenta pérdida parcial de la porción apical interna y plasmática de las células epiteliales llevándose en la secreción restos de éstas (figura 1) (Kierszenbaum, 2008). Dentro de esta secreción se liberan glóbulos de grasa con restos celulares, y es en estos glóbulos donde se encuentra el material citoplasmático, el aparato de Golgi, el RNA y el DNA. Los cuales no se degradan fácilmente debido a que los glóbulos les confieren un efecto protector (Broker 1980; Boutinaud *et al.*, 2004).

La histología de la GM es la misma en todos los mamíferos; presenta como componentes primarios: tejido glandular, conductos lactóforos (galactóforos) y alveolos (figura 1). Por lo que el proceso de síntesis de esta secreción es similar en todos los mamíferos, sin embargo, la composición láctea y la disposición anatómica de la GM varía entre las especies (Hovey *et al.*, 2002).

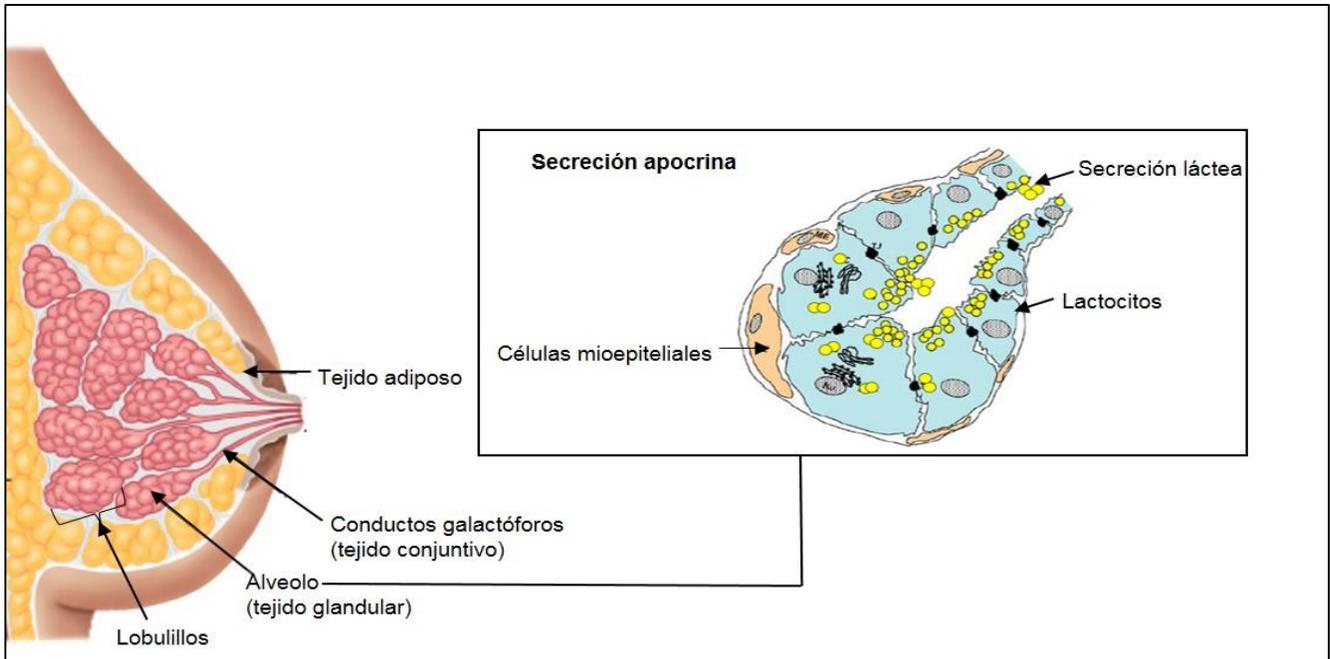


Figura 1. Fisiología y Morfología de la glándula mamaria (modificado de: Mobasheri y Barrett-Jolley, 2014).

1.3 Morfología de la glándula mamaria

En los humanos, la GM se encuentra en la parte posterior de la pared anterior del tórax, está conformada por tejido adiposo, conjuntivo y glandular de tipo túbulo- alveolar. El tejido adiposo le brinda protección y se encuentra en los espacios interlobulares, el tejido conjuntivo conecta los conductos lactóforos, a través de los cuales se transporta la secreción láctea y finalmente, el tejido glandular forma a los alveolos “sacos” donde se da la síntesis láctea (Aguilar y Villaverde, 2005). Los alveolos se ramifican formando lobulillos, los cuales a su vez están conformados por 15-20 lóbulos (acinos), cada uno de ellos presentan lactocitos (figura 1), estructuradas en capas, rodeadas por células

mioepiteliales que se contraen por acción de la oxitocina, ocasionando la eyección de la leche (Aguilar y Villaverde, 2005; Hovey *et al.*, 2002).

1.4 Fisiología de la glándula mamaria

La GM es un órgano especializado para la producción láctea, por lo que deben ocurrir tres periodos de crecimiento y maduración: mamotrófico, lactogénico y lactopoyético (figura 2), los cuales son regulados por el eje hipotálamo-hipofisario (Calana, 2008).

El periodo mamotrófico inicia durante el desarrollo embrionario del individuo, ya que el incremento de las concentraciones de estrógeno placentario, es la señal de inicio para la formación de los primordios mamarios que más adelante darán origen a los conductos lactóforos. Sin embargo, este desarrollo se queda en etapa de arresto durante la infancia por la presencia de testosterona (Hovey *et al.*, 2002).

Posteriormente, el periodo lactogénico comienza durante la etapa puberal-adulta, como respuesta de la disminución de testosterona y el incremento de la concentración de prolactina, estrógenos y progesterona que activan los procesos de diferenciación de los conductos galactóforos y el crecimiento alveolar (Calana, 2008).

Finalmente, en el periodo lactopoyético se concluye la maduración de la glándula e inicia la producción y secreción láctea en respuesta a estímulos hormonales y físicos (Lactancia). La producción se da por la disminución en las concentraciones de lactógeno y estrógenos placentarios, y de progesterona, aumentando la síntesis y secreción de prolactina. En cuanto a los estímulos físicos se encuentran: la succión y el llanto del neonato; estos estímulos en conjunto activan al eje hipotálamo-hipófisis-ovárico que

secreta a prolactina y oxitocina por medio de la adenohipófisis que se encuentra en el hipotálamo y son transportadas vía torrente sanguíneo hacia los alveolos (figura 3), activando a sus receptores que se encuentran en los lactocitos (Macias y Hink, 2002).

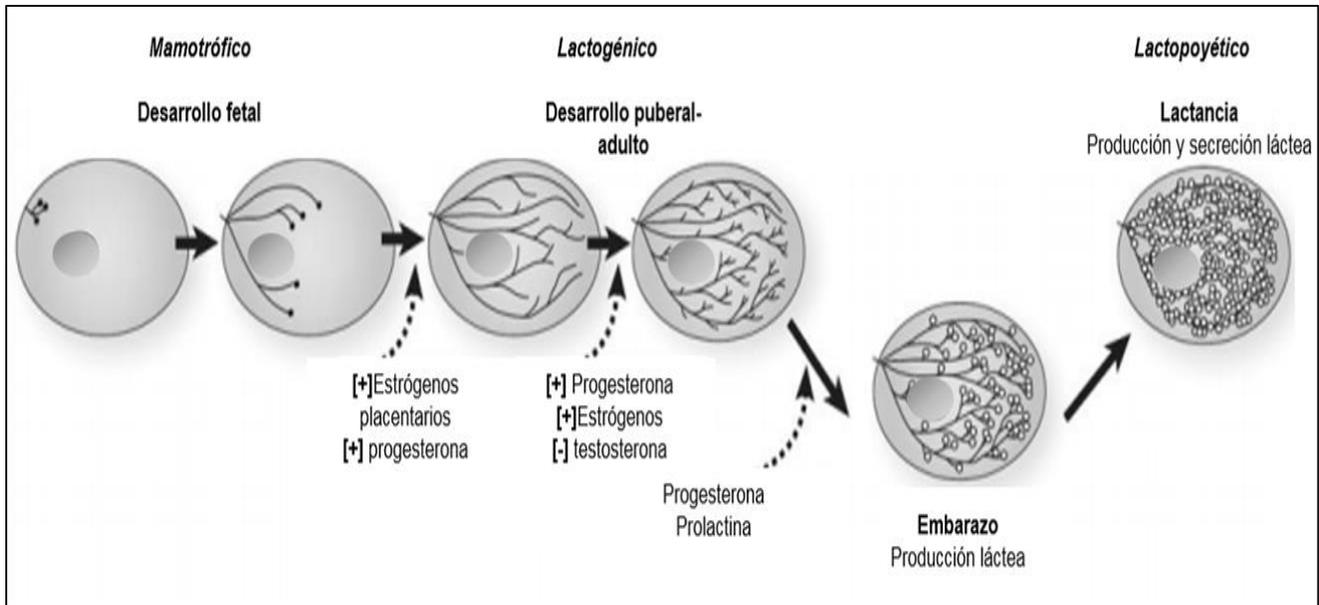


Figura 2. Etapas de desarrollo de la glándula mamaria. (Modificado de: Macias y Hinck, 2012).

Para la secreción de leche materna es necesaria la oxitocina que estimula a las células mioepiteliales que inducen la contracción de la capa miocelular perialveolar para la eyección de leche, a través del sistema de ductos galactóforos a los senos lactíferos (Arango, 2005). La cantidad secretada es proporcional a las veces que se producen los estímulos mecánicos, sin embargo, existen otros factores que influyen en ésta, como factores genéticos, la hora del día, el estado hídrico y emocional de la madre entre otros (Macías *et al.*, 2006).

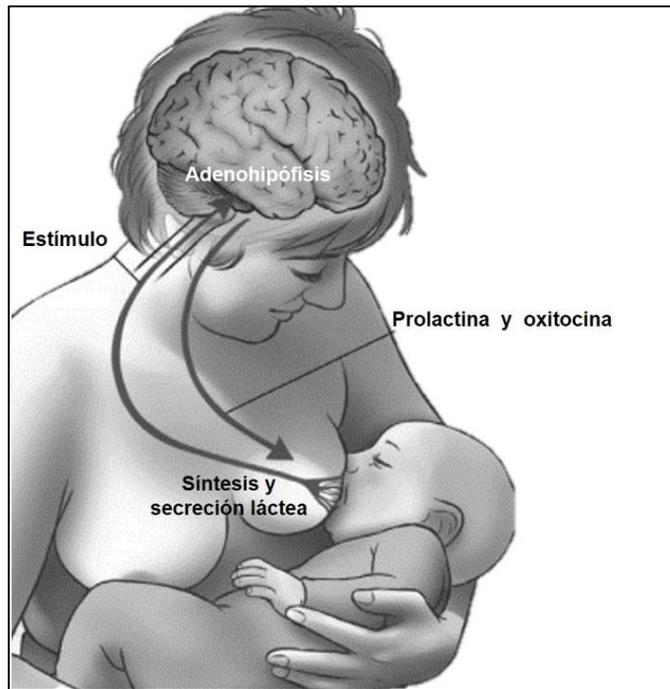


Figura 3. Eyección láctea estimulada por prolactina y oxitocina (Modificada de: Rioja Salud, 2010).

1.5 Lactancia materna

La lactancia materna es un proceso fisiológico fundamental, cuya finalidad es nutrir al neonato, a través de la ingesta de leche materna. La Leche humana (LH) es el alimento más recomendado para el recién nacido, al menos durante los seis primeros meses de vida; por su adecuado contenido de nutrientes, los cuales proveen el aporte energético que favorece el crecimiento infantil y que promueve el desarrollo y maduración del sistema inmunológico, el sistema nervioso central y la retina (OMS, 2015).

La composición de la leche materna varía durante la lactancia obedeciendo a las necesidades del lactante; distinguiéndose así tres tipos de leche: calostro, leche de transición y leche madura. Sin embargo, estos tres tipos de LH conservan los mismos componentes principales: proteínas, lípidos, carbohidratos, agua, minerales y vitaminas, aunque se modifican en su concentración (UNICEF, 2016; Calixto *et al.*, 2011).

1.6 Tipos de Leche Materna

En general, la LH es una mezcla homogénea que se compone de tres fases: la fracción de los “glóbulos de grasa”, la fracción de las “micelas de caseína” y la fracción soluble de los “constituyentes hidrosolubles”. La fracción de glóbulos de grasa corresponde a la fase en donde se concentran los constituyentes liposolubles (lípidos y vitaminas, entre otros) en forma de glóbulos cubiertos por una membrana fosfolipoproteica originada en el alveolo. La fracción de micelas corresponde a las caseínas, al calcio y al fosforo, que participan en el desarrollo estructural celular del lactante. La fracción soluble también está constituida por las moléculas biológicamente activas o “factores bioactivos”, que pueden intervenir en la regulación del metabolismo (Guerra de Almeida, 2008). A continuación, se describirá brevemente la composición de los tres tipos de leche establecidos por la UNICEF.

El calostro se produce durante los primeros siete días posparto, se caracteriza por tener una coloración amarillenta conferida por la presencia de β -carotenos. Tiene un alto contenido de proteínas (hormonas, factores de crecimiento e inmunoglobulinas) y bajo contenido en lípidos e carbohidratos (tabla 1), por lo que es adecuada para las

necesidades calóricas del neonato; el volumen producido es de 180mL aproximadamente por día (Casanueva *et al.*, 2009).

A partir del octavo día las concentraciones de las proteínas, los lípidos y los carbohidratos se modifican dando como resultado la leche de transición, donde disminuye la concentración de las proteínas, e incrementa la de los lípidos y los carbohidratos así como el volumen producido, el cual puede alcanzar entre 600 a 800mL por día (UNICEF,2016).

Finalmente, para el día quince las concentraciones vuelven a modificarse teniendo así la leche madura, la cual va a presentar una mayor concentración de lípidos y carbohidratos y una menor concentración de proteínas, en comparación con el calostro y la leche de transición (tabla 1), el volumen producido de este tipo de leche es de 900mL aproximadamente por día (Aguilar, 2005; UNICEF, 2016).

Tabla 1. Composición de la leche materna de población rural mexicana.

Nutrimento	Calostro	Leche de transición	Leche madura	
	Población rural mexicana			OMS
	g/100mL			
Proteínas	0.83	0.77	0.73	0.9
Lípidos	3.28	3.57	3.68	3.8
Carbohidratos	6.25	6.5	6.8	7.0

(Modificada de: Casanueva *et al.*, 2009; Barbosa *et al.*, 1997; Villalpando *et al.*, 1992).

1.7 Componentes de la leche

1.7.1 Macronutrientes y Micronutrientes

Dentro de los macronutrientes de la LH se incluyen: carbohidratos, siendo la lactosa el disacárido más abundante, seguido por la glucosa, los lípidos principalmente los triglicéridos y las proteínas como: caseína, lactoferrina y α -Lactoalbúmina entre otras. Dentro de estas proteínas se encuentran diferentes hormonas: insulina y factores de crecimiento entre otros; y dentro de los micronutrientes se incluyen: minerales Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} y Mg^{2+} , enzimas, aminoácidos libres y vitaminas A, D, K (McManaman *et al.*, 2006; Macías *et al.*, 2006).

1.7.2 Hormonas

Dentro de los factores bioactivos presentes en la LH se encuentran diversas hormonas como: la prolactina, esteroides suprarrenales y ováricos, prostaglandinas, insulina, calcitonina entre otras. Además, se han identificado algunas hormonas cuya función biológica es mantener la homeostasis alimenticia, por lo que al ser secretadas en la LH podrían influir en el lactante. Dentro de estas hormonas secretadas en la leche materna que regulan la ingesta de alimentos (HRI) se sabe que se encuentran las orexigénicas (promueven la ingesta de alimentos) como: resistina y grelina y las anorexigénicas (inhiben la ingesta de alimentos) como: leptina. Por otro lado, existen hormonas que pueden llevar a cabo la señal orexigénica o anorexigénica, tales como: adiponectina, irisina y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1); estas señales están relacionadas con los cambios en la disponibilidad de nutrientes necesarios para la obtención de

energía; dentro de estos estímulos se encuentran los niveles de glucosa y de ácidos grasos en sangre (Savino *et al.*, 2009; UNICEF, 2016).

1.8 Regulación de la ingesta de alimentos

1.8.1 Mecanismo del apetito

La homeostasis energética implica una asociación entre el aporte energético y el consumo del mismo, por ello su regulación es importante. Y la alteración de este equilibrio puede desencadenar obesidad o desnutrición (González y Río, 2012).

Para regular la vía **orexigénica** y la vía **anorexigénica** es necesario un mecanismo neuroendocrino en el que participan el sistema nervioso central (SNC), el tracto gastrointestinal (TGI) y el tejido adiposo blanco (TAB), cada uno de éstos secreta hormonas que viajan a través del torrente sanguíneo para llevar el estímulo al hipotálamo, particularmente al núcleo arcuato (ARC). Los neuropéptidos que activan la respuesta orexigénica son el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con agouti (AgRP); por otra parte la vía anorexigénica es inducida por la proopiomelanocorticona (POMC) y el transcrito relacionado con cocaína y amfetamina (CART) (figura 4). Adicionalmente, en ambas vías participan otras moléculas (como la glucosa e insulina) y péptidos (como el péptido similar al glucagón) que igualmente, se encuentran implicados en esta regulación (Jaimes *et al.*, 2005).

Cuando el individuo requiere un aporte energético o presenta periodos prolongados de ayuno, se producen señales fisiológicas como la liberación de grelina (sintetizada en el tracto gastrointestinal) en sangre iniciando la vía orexigénica, también se observa un ascenso en la concentración de resistina (sintetizada en los adipocitos), estas hormonas

se unen a sus receptores, ocasionando la activación de neuronas presinápticas que sintetizan al NPY y a AgRP en el núcleo arcuato que se localiza en el hipotálamo, dando como resultado el estímulo de ingesta de alimento. Una vez que se ha cubierto la demanda energética, las hormonas anorexigénicas detectan la elevación del nivel plasmático de ácidos grasos y de glucosa, por lo que se desencadena la vía de saciedad, disminuyendo las concentraciones de resistina y grelina e incrementando los niveles de leptina (secretada por los adipocitos), que se une a neuronas postsinápticas que expresan a *POMC* y *CART*, inhibiendo la síntesis del NPY y con ello la ingesta de alimento (Schwartz, 2003; Stark *et al.*, 2013). En cuanto a adiponectina, irisina e IGF-1 realizan su función en relación a la concentración de triglicéridos principalmente en sangre (González y Rio, 2012).

Regulación de ingesta alimenticia (SNC-TGI-TAB*)

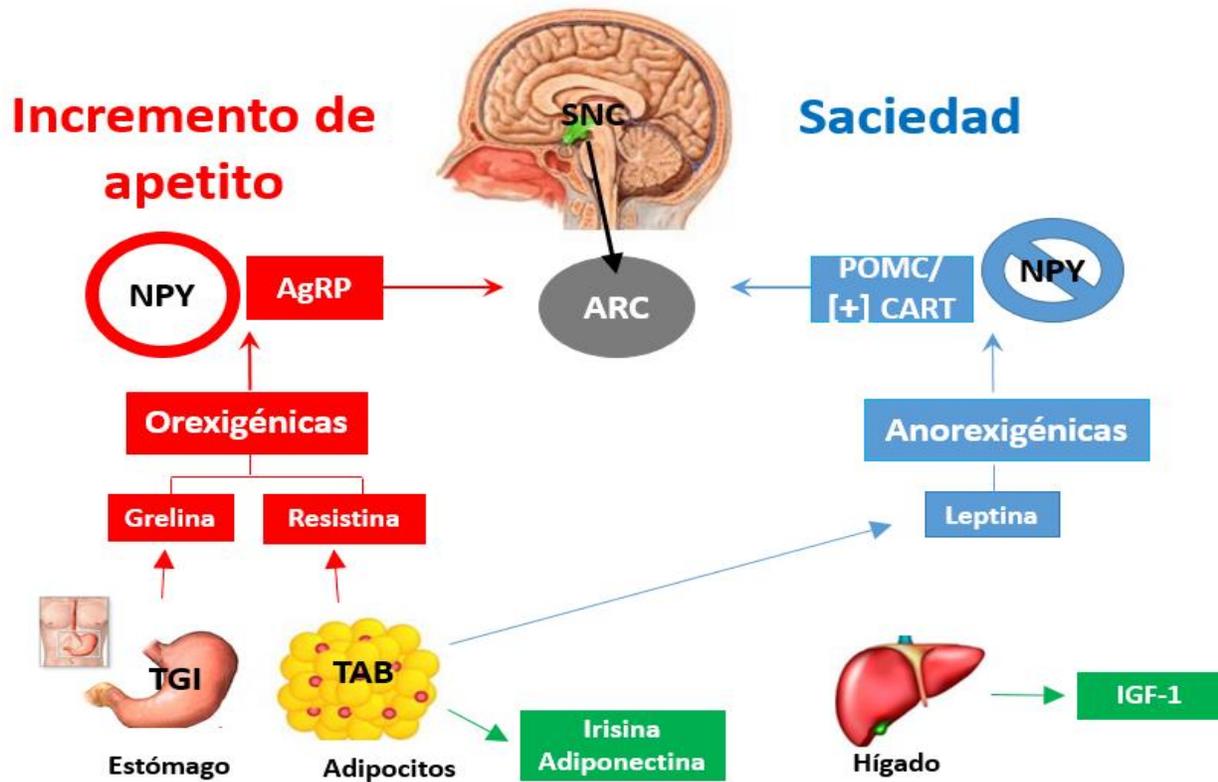


Figura 4. Regulación de la ingesta alimenticia. (*SNC: sistema nervioso central; TGI: Tracto gastrointestinal; TAB: Tejido adiposo blanco; NPY: Neuropeptido Y; *AgRP*: Proteína relacionada con agouti; *POMC*: Proopiomelanocorticona; *CART*: Transcrito relacionado con cocaína y amfetamina) (Modificada de González y Río, 2012).

1.8.2 Hormonas orexigénicas

Grelina

Esta hormona es codificada por el gen *GHRL*, se localiza en el brazo corto del cromosoma 3 en la región p2 en la banda 5-6, está conformada por 28 aminoácidos. Es producida principalmente en el estómago e intestino. Su mecanismo de acción es antagónico a la leptina, al estimular la síntesis del NPY y *AgRP* e inhibir la actividad de la *POMC* (Llamas

et al., 2015). La grelina detecta la disminución en las reservas de energía, además de promover el almacenamiento de los ácidos grasos en los adipocitos induciendo un balance positivo de energía (Campos *et al.*, 2006).

Resistina

Codificada por el gen *RETN* en el brazo corto del cromosoma 19 en la región 1 banda 3 sub-banda 2 y consta de 108 aminoácidos. Es producida principalmente por los adipocitos y se expresa en el hipotálamo, esta hormona se encuentra ligada con la resistencia a la insulina y a procesos inflamatorios en personas obesas. La resistina promueve la ingesta de alimentos a corto plazo, por lo cual se encuentra asociada con la expresión del mRNA del NPY y del AgRP además, participa en la homeostasis de la glucosa, al inhibir su captación, la cual es estimulada por la insulina (Nogueiras *et al.*, 2005).

1.8.3 Hormonas anorexigénicas

Leptina

La leptina es codificada por el gen *LEP* en el brazo largo del cromosoma 7 en la región q3 banda 1 sub-banda 3, está conformada por 146 aminoácidos. Su síntesis se lleva a cabo principalmente en los adipocitos, aunque también se ha reportado en la placenta y la mucosa gástrica, entre otros. Sus concentraciones circulantes son equivalentes a la

cantidad de tejido adiposo por lo que es indicador de las reservas energéticas, además de inhibir el estímulo del apetito (Ilcol *et al.*, 2006; Becerra *et al.*, 2015).

1.8.4 Hormonas con ambas funciones

Adiponectina

Esta hormona es codificada por el gen *ADIPOQ* en el brazo largo del cromosoma 3 en la región q3 banda 2 sub-banda 7, está compuesta por 244 aminoácidos. La adiponectina es sintetizada por el tejido adiposo. Su principal función es regular el metabolismo energético, determinando su función en relación a la concentración de triglicéridos plasmáticos, además estimula la oxidación de ácidos grasos y aumenta la sensibilidad a la insulina favoreciendo la captación de la glucosa para su posterior metabolismo (Domínguez 2007; Palomer *et al.*, 2004; Velázquez y Huerta, 2011).

Irisina

La irisina es codificada por el gen *FNDC5*, formada por 99 aminoácidos. Su síntesis se lleva a cabo en el tejido adiposo. Esta hormona se relaciona con la conversión de tejido adiposo blanco en tejido adiposo marrón, por lo cual influye en la termogénesis adaptativa principalmente en el neonato (Boström *et al.*, 2012).

IGF-1

Esta hormona es codificada por el gen *IGF-1* que se ubica en el brazo largo del cromosoma 12 en la región q12. *IGF-1* está conformada por 99 aminoácidos. La síntesis

de esta hormona se lleva a cabo en diversos órganos principalmente en el hígado y el páncreas. IGF-1 tiene efectos similares a los de la insulina sobre el músculo al estimular el transporte de aminoácidos y glucosa, además IGF-1 participa en el crecimiento embrionario, neonatal e infantil (Savino *et al.*, 2005; Stanley *et al.*, 2014).

2. ANTECEDENTES

Actualmente, existe evidencia de que las hormonas referidas con anterioridad se encuentran en la leche materna, aunque no hay mucha información sobre la identificación de sus transcritos en la glándula mamaria y el cambio en la expresión de éstos durante la lactancia. A continuación, se presentan algunos de los trabajos más consistentes que justifican este proyecto de tesis.

Grelina

Gnanapavan y colaboradores en el 2002, mostraron que el mRNA de grelina se expresa en tejido glandular mamario humano (*post mortem*), a través de la extracción del RNA utilizando SV total RNA isolation system seguido de una PCR en tiempo real. Concluyen que el gen *GHRL* se expresa en este tipo de tejido. Asimismo, Kierson y colaboradores en el 2006, identificaron la expresión del transcrito del gen *GHRL* en cultivos de líneas celulares de tejido epitelial glandular mamario humano (HMEC). Por otro lado, en el 2006 Aydin y colaboradores identificaron por primera vez la presencia de esta hormona en la LH además, determinaron los cambios en su concentración en diferentes etapas de la lactancia, por medio de radioinmunoensayo (RIA) en 17 mujeres que se encontraban en periodo de lactancia, a las cuales se les tomaron muestras de los tres tipos de leche (calostro, transición y madura). Concluyendo que la concentración más alta se obtuvo en la leche madura (97.3 ± 13 pg/mL) seguida de la leche de transición (83.8 ± 18 pg/mL) y la concentración más baja se encontró en el calostro (70.3 ± 18 pg/mL). También se reportó una correlación positiva en la concentración de grelina entre el calostro y la leche

de transición ($r = 0.697$, $p = 0.002$), y entre la leche de transición con leche madura ($r = 0.841$, $p < 0.001$). Las evidencias mencionadas demuestran la expresión de dicho gen en la GM, sin embargo, debido a los cambios en la concentración de grelina a lo largo de la lactancia, se plantea que su expresión podría modificarse en los tres tipos de leche.

Resistina

Los primeros estudios sobre esta hormona se realizaron en rumiantes, durante el 2003 por Komatsu y colaboradores, quienes determinaron la expresión de *RETN* en la glándula mamaria de 4 rumiantes (vacas) lactando y sin lactar. Extrajeron el RNA por medio del método de TRIzol, posteriormente realizaron una PCR en tiempo real. Reportaron la expresión del mRNA de resistina en el tejido mamario. Sin embargo, en este estudio no se demostró el tipo celular específico del tejido mamario que expresa el transcrito de la grelina.

En el 2008 se identificó por primera vez la presencia de esta hormona en la LM por Ilcol y colaboradores. Posteriormente, los mismos autores reportaron cambios en la concentración de resistina en diferentes tipos de LH y los compararon con la sangre materna de 160 mujeres. Estas muestras fueron analizadas a través de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), encontrando que la concentración de resistina en el suero materno y en el calostro al día 1-4 posparto (5800 ± 1100 y 1710 ± 68 pg/mL, respectivamente) fue mayor que en el suero materno y en la leche madura al día 30-180 postparto (2060 ± 300 y 670 ± 18 pg/mL respectivamente). Asimismo, encontraron una correlación positiva entre la concentración de resistina en suero y en leche materna ($r = 0.822$, $p < 0.001$). Si bien, estos estudios nos brindan

información sobre la presencia de esta hormona en la LH y su expresión génica en la GM de vaca, hasta el momento se desconoce si los lactocitos del humano participan en la síntesis de resistina al incrementar sus concentraciones durante la lactancia materna.

Leptina

Se reportó la presencia de leptina por primera vez en LH en 1997, por Casabiell y colaboradores. Por otra parte, Smith y colaboradores en 1998, analizaron la expresión de su transcrito en cultivos celulares epiteliales provenientes de la glándula mamaria humana. Para esta investigación, a partir del mRNA total, se sintetizó cDNA mediante transcripción reversa acoplado a PCR, reportando la expresión de *LEP* en las células epiteliales secretoras de leche.

En el 2014, Brunner y colaboradores compararon la concentración de leptina entre plasma y leche materna de 172 mujeres a las 6 semanas y 4 meses post-parto. Al analizar las muestras mediante la técnica de RIA, observaron una mayor concentración de leptina en plasma (8.56 ± 9.52 ng/mL) en comparación con LH (0.11 ± 0.19 ng/mL) a las 6 semanas y a los 4 meses. Sin embargo, a los 4 meses encontraron una menor concentración tanto en plasma (8.30 ± 10.64 ng/mL) como en LH (0.09 ± 0.18 ng/mL) en comparación a las 6 semanas. No obstante, se desconoce si la síntesis de leptina en los lactocitos se modifica durante el periodo de lactancia.

Adiponectina

La adiponectina fue reportada por primera vez en LH por Martin y colaboradores en el 2006. Sin embargo, en el 2011 Ohtani y colaboradores, descubrieron la expresión del transcrito de esta hormona en la GM de rumiantes; extrajeron RNA total por el método de TRizol, de tejido mamario de 9 vacas que se encontraban en diferentes periodos de lactancia (2 y 8 meses post-parto y al finalizar la lactación de sus crías), reportando que la expresión de adiponectina se redujo significativamente durante la lactancia.

Posteriormente Ley y colaboradores en el 2012, determinaron la concentración de adiponectina en calostro y leche madura de 164 mujeres, utilizando la técnica ELISA. Encontrando una mayor concentración en calostro (50ng/mL) comparado con leche madura (12.3ng/mL). La evidencia mostrada sugiere que la GM podría estar participando en la síntesis de adiponectina dado a que expresa el gen *ADIPOQ*, siendo en parte responsable de los cambios en la concentración en los diferentes tipos de leche.

Irisina

Aydin y colaboradores en el 2013, determinaron la concentración de irisina, mediante ELISA en 15 mujeres sanas y en 15 mujeres con diabetes mellitus gestacional (DMG), de las cuales se obtuvieron muestras de leche y sangre periférica, utilizando como controles 14 muestras de sangre de mujeres sanas sin lactar. Los resultados de este estudio demostraron que la concentración de irisina fue menor en leche y en suero (320 ± 50 ng/mL, 250 ± 40 ng/mL respectivamente) de mujeres sanas respecto a la de mujeres con DMG (leche 552 ± 60 ng/mL, suero 520 ± 50 ng/mL), además, la concentración sérica de irisina fue menor en las mujeres sin lactar (350 ± 50 ng/mL), en comparación con las

mujeres que se encontraban lactando. Hasta el momento no existe alguna evidencia que explique el cambio en la concentración de irisina durante la lactancia, sin embargo, se ha sugerido una posible participación del tejido glandular mamario en la síntesis de irisina.

IGF-1

Actualmente se desconoce con exactitud la función que tiene esta hormona en la leche humana, aunque se sugiere que podría ejercer un efecto positivo en el lactante, debido a su participación directa en el crecimiento post-natal favoreciéndolo considerablemente (Savino *et al.*, 2005). Aunado a lo anterior Milsom y colaboradores en el 2008 realizaron un estudio donde evaluaron los cambios en la concentración de esta hormona en 23 muestras de los tres tipos de leche materna, a través del método de RIA. Encontrando que la concentración de IGF-1 tuvo una disminución moderada en la leche materna durante los primeros 3 meses posparto (5.0ng/mL, 3.0ng/mL, 2.0ng/mL, respectivamente) y a partir del mes 4 hasta el mes 9 la cantidad de esta hormona se mantuvo estable (por debajo del límite de detección del ensayo). Hasta el momento se desconoce si el tejido mamario tiene alguna participación en la expresión del gen que codifica para el IGF-1 tal y como se ha propuesto para otras hormonas y así participar en la síntesis de hormonas que se secretan en la leche influyendo así, en los cambios en la concentración de esta hormona en los diferentes tipos de leche.

Con base a las evidencias presentadas de que el transcrito de grelina y leptina se expresa en la glándula mamaria, es posible que en los restos de lactocitos se expresen los genes que codifican para resistina, adiponectina, irisina e IGF-1, modificando la

expresión de éstas en los tres tipos de leche materna en respuesta a la demanda del lactante.

3. JUSTIFICACIÓN

La ingesta de leche materna provee múltiples beneficios al lactante tanto a corto como a largo plazo, teniendo así un papel biológico fundamental para su nutrición, desarrollo y crecimiento. Estos beneficios son atribuidos en parte a las proteínas presentes, las cuales desempeñan diversas funciones, por ejemplo; las *inmunológicas* que brindan protección contra antígenos bacterianos y virales; las *neurológicas* al contribuir en el desarrollo del SNC y las *reguladoras* al participar en la homeóstasis metabólica. Dentro de estas últimas se encuentran las hormonas que regulan la ingesta de alimentos, que si bien es conocida su función biológica, aún se desconoce qué efecto podrían tener en el lactante al estar presentes en la leche materna. La poca información existente muestra que la concentración de estas hormonas se modifica durante la lactancia. Aunque se sugiere que este cambio podría ejercer un papel importante en la homeóstasis alimenticia, el crecimiento y el desarrollo neonatal e infantil, hasta el momento no se han reportado estudios que expliquen el papel fundamental de estas hormonas contenidas en la leche materna.

Por otro lado, debido a que existen reportes de que el transcrito de algunas hormonas que regulan la ingesta de alimentos como grelina, leptina y adiponectina se expresa en el tejido glandular mamario, se ha propuesto que el tejido mamario también puede sintetizar estas hormonas. Sin embargo, se desconoce si el transcrito de la resistina, irisina e IGF-1 también son expresados en la glándula mamaria. Por lo que, es necesario realizar estudios que determinen si el tejido mamario participa en la síntesis de las hormonas que regulan la ingesta de alimentos, modificando la expresión de éstas en la leche materna en respuesta a la demanda del lactante. El presente trabajo pretende

aportar conocimiento acerca de la expresión del mRNA de las HRI en la GM para su síntesis y secreción en la leche materna.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cambio en la concentración de las hormonas que regulan la ingesta de alimentos en la leche materna podría estar relacionada con la síntesis de éstas en el tejido glandular mamario por lo que se establecieron las siguientes preguntas:

¿Los lactocitos expresan los genes que codifican para las hormonas grelina, resistina, leptina, adiponectina, irisina e IGF-1?

¿La expresión de éstas hormonas se modifica en función de los tres tipos de leche materna?

5. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar los cambios en la expresión de los genes que codifican para las hormonas grelina, resistina, leptina, adiponectina, irisina e IGF-1 en lactocitos presentes en calostro, leche de transición y leche madura de mujeres.

Objetivo particular

- Identificar el transcrito *GHRL*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOQ*, *FNDC5* e *IGF-1* en los restos de lactocitos del calostro.
- Determinar el perfil de expresión génica de *GHRL*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOQ*, *FNDC5* e *IGF-1* en los restos de lactocitos de calostro, leche de transición y leche madura.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño de estudio

Descriptivo, longitudinal y prospectivo.

6.2 Población de estudio

Se incluyeron mujeres primigestas clínicamente sanas en periodo de lactancia. Las cuales fueron captadas durante el embarazo, a través de Talleres educativos sobre lactancia (beneficios, técnicas de extracción, creación de banco de leche), impartidos en las Unidades de Medicina Familiar No. 04 y 26 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) durante el mes de septiembre del 2015 a enero del 2017.

6.3 Aspectos éticos

Dentro de los aspectos éticos, esta investigación formó parte del proyecto *“Composición de la leche durante la lactancia de mujeres con sobrepeso u obesidad: macronutrientes y hormonas reguladoras de la ingesta alimenticia”* con número de registro ante la Comisión Nacional de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, R-2015-785-045, con riesgo considerado como mínimo.

En cuanto a los beneficios para las participantes, se les brindó asesoría nutricional durante la lactancia y un reporte sobre sus parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol, triglicéridos).

6.4 Variables de estudio

Variables independientes

- Tipo de leche materna (calostro, leche de transición y leche madura).

Variables dependientes

- Expresión de los genes *GHRL*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOQ*, *FNDC5* e *IGF-1* en los tres tipos de leche materna.

6.5 Criterios

Criterios de inclusión

- Mujeres primigestas.
- Entre los 18 y 35 años de edad.
- Sin antecedentes de tabaquismo, alcoholismo y consumo de drogas durante el embarazo.
- Embarazo normo-evolutivo.
- Gestación a término de 37 semanas.
- Producto único.
- Peso al nacimiento mayor a 2,5 kg.
- Lactancia exclusiva el primer mes de vida.
- Firma de las mujeres participantes en la carta de consentimiento.

Criterios de eliminación

Se eliminaron a aquellas mujeres que presentaron afecciones materno-infantiles durante el estudio, que suspendieron la lactancia o que decidieron abandonar el estudio.

6.7 Procedimientos

6.7.1 Trabajo de campo

Para la obtención de las muestras de leche se realizaron 3 visitas domiciliarias, las cuales se programaron entre los días 5-7, 10-14 y el día 30 después del parto, para tomar los tres tipos de leche (calostro, transición y madura, respectivamente). La extracción de leche se llevó a cabo simultáneamente en ambos pechos hasta su vaciamiento con una bomba eléctrica grado hospitalario marca Medela Lactina Select, a la cual se le instalaron mangueras de látex unidas a las copas de extracción con biberones previamente esterilizados. Simultáneamente, se realizó un masaje “circular” (en contra de las manecillas del reloj) y de “barrido” (con dirección de arriba hacia abajo) comenzando desde la parte superior de ambos pechos. La leche colectada se homogenizó y agitó, posteriormente se tomaron 5mL en tubos cónicos (Falcón) estériles libres de RNAsas, los cuales se transportaron en frío al laboratorio para su análisis.

6.7.2 Trabajo de laboratorio

Extracción de RNA

A partir de 5mL de leche materna se separó la capa de grasa mediante centrifugación (Hettich 320-R) a 4°C y 4010 rpm durante 15 minutos, removiéndola a tubos eppendorf. A continuación se extrajo el RNA total por el método de *Maningat y Chomczynski* (TRIzol) modificado. A la muestra se le agregó 1mL de TRIzol y se homogenizó con el vórtex. Posteriormente, se centrifugó (Allegra X-22R) a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C y se tomó la fase media para transportarla a otro microtubo donde, se agregaron 200µL de cloroformo y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Después, se extrajo la

fase acuosa y se agregaron 500µL de isopropanol. La muestra se dejó durante 24 horas a -72°C. A continuación, se centrifugó bajo las condiciones anteriormente mencionadas y se decantó el precipitado de la muestra. Se agregó 1mL de etanol, y se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C. Finalmente, se quitó el sobrenadante para dejar secar el botón durante 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se resuspendió la muestra con 20µL de agua grado biología molecular.

Integridad, cuantificación y pureza del RNA total

La integridad del RNA total obtenido de cada muestra, se verificó por medio de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, utilizando 1µg de cada una de las muestras.

La visualización del RNA se realizó mediante luz UV con un transiluminador (Multimage™ Light Cabinet), como agente intercalante se utilizó bromuro de etidio. Es importante considerar que para complementar el análisis acerca de la calidad del RNA fue necesario cuantificarlo por espectrofotometría (Nanodrop ND-100, Thermo Scientific) y verificar el coeficiente 260/280nm, que indica el grado de pureza de la muestra. El coeficiente de pureza para ácidos nucleicos, debe estar entre 1.6-2.0, lo que indica que tiene una pureza aceptable para análisis posteriores. Finalmente, el RNA se utilizó para sintetizar el cDNA mediante transcripción reversa.

Síntesis de cDNA

Para sintetizar el cDNA se utilizaron 2µg del RNA total. El cual se homogeneizó con los componentes del kit TaqMan Reverse Transcription Reagents: 5µL de RT buffer (1X), 11µL MgCl₂ (1.75mM), 10µL dNTP (0.5mM), 2.5µL oligo dT (2.5 µM) 1µL inhibidor de

RNAasas (1U/ μ L), 1.23 μ L transcriptasa reversa (2.5U/ μ L) y 18.25 μ L H₂O HyPure. El cDNA se utilizó para realizar el análisis de la expresión de los genes mediante PCR punto final, utilizando al gen *β -actina* como gen de referencia.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) punto final.

La PCR punto final del gen de referencia, se llevó a cabo para evaluar la síntesis correcta de cDNA.

Las reacciones se realizaron con el kit TaqMan DNA polymerase, recombinant. Se usaron 2.5 μ L de buffer PCR (1X), 1 μ L dNTP mix (0.2 mM), 0.75 μ L MgCl₂ (1.5 mM), 1 μ L *primer forward* (0.5 μ M) y *reverse* (0.5 μ M) *β -actina* (respectivamente), 2 μ g cDNA de cada muestra, 0.2 μ L taq polymerase (2.5U/rn), 16.55 μ L H₂O HyPure. Posteriormente, se programó el termociclador Biometra, considerando para el primer ciclo las siguientes temperaturas; 95 °C (5 minutos), 65°C (1 minuto), 72 °C (1 minuto y 30 segundos).

Posteriormente la amplificación se llevó a cabo, aproximadamente durante 33 - 37 ciclos, dependiendo de la expresión cada transcrito, a temperaturas de 95, 62, y 72°C seguido por 95, 64, 72 y 4°C durante 1 minuto, respectivamente.

A continuación, se preparó un gel de agarosa al 1% (0.5 μ g/mL) teñido con 2 μ L de colorante como agente intercalante se utilizó 1 μ L de bromuro de etidio y se colocó un marcador de 100pb (pares de bases). Finalmente se realizó una electroforesis por 60 minutos a 400mA, 90 Volts para corroborar que el producto obtenido era el cDNA, demostrando así la eficiencia de la reacción.

Cuantificación de los transcritos mediante PCR en tiempo real

Para llevar a cabo la PCR en tiempo real, se utilizó el kit DNA Green Master, H₂O libre de nucleasas y H₂O grado biología molecular (HyClone). Por lo que previamente, fue necesario diseñar los *primers* (oligonucleótidos) por lo cual se accedió a la base de datos de la NCBI (por sus siglas en inglés *National Center for Biotechnology Information*). Posteriormente, con el programa *Pick Primers* (Primers 3 version 4.0.0) se procedió al diseño de estos oligonucleótidos. Una vez obtenidos, se seleccionaron dos pares por cada gen.

Dentro de las características para el diseño de los *primers* se consideró que cada uno de éstos cumpliera con las especificaciones necesarias para ser utilizados. En cuanto al tamaño se buscó que los fragmentos flanqueados fueran cortos, máximo 200 pb y que estuvieran localizados en sitios conservados que no involucraran más de dos exones, cuya posición no se encontrara en los extremos de las secuencias de los mensajeros. También se consideró que el contenido de CG no sobrepasara el 60%, ya que esto incrementaría el valor de la TM (temperatura media de alineación), de igual forma se estableció como criterio, que la diferencia entre las TM teóricas de cada par de *primers* no excediera 1°C. Finalmente se verificó que la región flanqueada por ambos *primers* tuviera un valor de ΔG (-) ya que esto hace referencia a la espontaneidad de la reacción por lo cual se vería favorecida. En la Tabla 2 se muestra la secuencia de los *primers* diseñados.

Tabla 2. Secuencia de PRIMERS

Gen	Primer forward	Primer reverse
Genes de estudio		
GHRL	CTgAgCCCTgAACACCAGAg	CTgCTggTACTgAACCCCTg
RETN	CCCACCgAgAgggATgAAAg	CTCCAggCCAATgCTgCTTA
LEP	AATgCATTggggAACCCCTgT	AggAgACTgACTgCgTgTgT
ADIPOQ	TTCTgCCTTCCgCAgTgTAg	TAgCCAgATggTgTggCTTg
FNDC5	CCgCCAgTATgACATCATTgAA	TTgggTTTgTAgTgCAgCCT
IGF-1	ATgTATTgCgCACCCCTCAA	gCACTCCCTCTACTTgCgTT
Gen de referencia		
β-ACTINA	TggAATCCTgTggCATCCATg	TAAAACgCAgCTCAgTAACAg
Genes tejido específico		
CASEINA	CAACggTggACAgTgTAgTCA	AggCAgACAAATggCTgAAg
α-LACTOALBÚMINA	CATAATgTgCCAAGAAgATCCT	gCCACTgTTCCAgCTTCTCAgT

GHRL: grelina; **RETN:** resistina; **LEP:** leptina; **ADIPOQ:** adiponectina; **FNDC5:** irisina; **IGF-1:** factor de crecimiento Insulínico tipo 1.

Como gen constitutivo se utilizó a β -actina, y para confirmar que el RNA provenía de células epiteliales mamarias se utilizaron los oligonucleótidos de α -Lactoalbúmina y de caseína que son de expresión tejido específico.

Para realizar la PCR en tiempo real se usó el termociclador Lightcycler Nano (Roche) y como marcador se utilizó el fluorocromo SYBR Green. La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 20 μ L considerando lo siguiente: SYBR, 40pmol de cada *primer* 4 μ L de Master^{PLUS} SYBR Green, 2.5 μ g de cDNA, buffer para PCR, MgCl₂ 3.5mM en capilares de borosilicato de 20 μ L. Posteriormente, para desnaturalizar el cDNA se preincubó a 95°C por 10 minutos. La amplificación inicio con 35 ciclos a 95°C por 10

segundos y la temperatura para la alineación fue 60°C por 7 segundos, finalizando con la emisión de fluorescencia.

Para el análisis de la expresión se consideró el *punto de corte* (Cp) o *ciclo umbral* (Cq) que se refiere al momento en el cual comienza el incremento en la fluorescencia. Se realizaron los cálculos para ΔCt donde se consideró el promedio del Cq obtenido para cada uno de los genes de interés menos el Cq del gen *β -actina*. Posteriormente se realizó la siguiente operación $2^{-\Delta Ct}$, sin embargo, para detallar el análisis fue necesario calcular $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en unidades relativas, tomando como referencia la expresión del gen en calostro.

Análisis estadístico

El análisis de datos se efectuó con el programa SPSS versión 21 Software, con un intervalo de confianza considerado del 95% ($P = <0.05$). De forma inicial se determinó la distribución de los datos; por lo que los valores se expresaron como mediana y rangos intercuartílicos. Posteriormente, los valores se compararon con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, así como la prueba Post-prueba de U de Mann Whitney para corroborar la significancia de los datos.

7. RESULTADOS

Características generales de las participantes

En este estudio se incluyeron 15 mujeres en periodo de lactancia. A estas mujeres se les tomó muestra de leche en diferentes días que correspondió a calostro, leche de transición y leche madura para el análisis de la expresión de los genes *GHRL*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOQ*, *FNDC5* e *IGF-1*. A continuación, en la tabla 3 se muestran los datos demográficos de las mujeres que participaron en el estudio. Los datos se presentan como medianas del peso, talla, edad e índice de masa corporal (IMC) de las participantes durante el primer mes posparto. Aunque se observó una disminución en el peso corporal, no hubo diferencias significativas en esta disminución. En cuanto al IMC, éste se modificó de acuerdo al peso, por lo que para la primera y la segunda semana postparto la mediana corresponde a un IMC considerado como sobrepeso (25 –29.9 kg/m²), no obstante al concluir el estudio la mediana se posicionó con un IMC considerado como peso normal (<18.5 –24.9 kg/m²), de acuerdo a lo referido por la OMS (2015).

Tabla 3. Datos demográficos de las participantes.

	1er semana Postparto	2da semana Postparto	30 días postparto
Peso (Kg)	66.6 (48.3, 87.7)	64.5 (48.7, 87.5)	63.7 (45.8, 88.0)
Talla (cm)	159.6 (150, 172)		
Edad (años)	25.1 (18, 33)		
IMC*	26.5 (20.3, 33.6)	25 (21, 33.5)	23.55 (19.8, 33.7)

Los datos se representan como medianas (mínimo, máximo) con una postprueba de U de Mann Whitney. *Índice de Masa Corporal = peso (Kg)/ talla (cm)².

Para identificar la expresión en las células del tejido mamario de los transcritos *GHRL*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOQ*, *FNDC5* e *IGF-1*, se extrajo el RNA total de las muestras obtenidas para su posterior análisis.

Integridad y cuantificación del RNA total

Se extrajeron 45 muestras de RNA total provenientes de los restos de lactocitos obtenidos de los tres tipos de leche: calostro (C), transición (T) y madura (M). La figura 5 corresponde al RNA total obtenido de los tres tipos de leche provenientes de **una** de las quince mujeres, donde es posible distinguir en las tres muestras referidas las subunidades ribosomales del RNA (28S 18S y 6S) como bandas bien definidas, debido a esto se pudo determinar que el RNA total estaba integro.

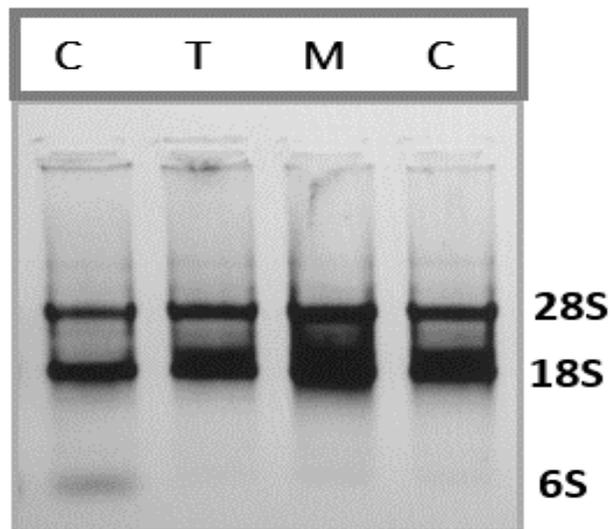


Figura 5. Integridad del RNA de los tres tipos de leche materna (C: calostro. T: transición, M: madura).

Para complementar el análisis de la calidad del RNA, fue indispensable cuantificarlo. En cuanto a los coeficientes de pureza obtenidos para cada muestra, los valores oscilaron entre 1.68 y 1.91 lo cual demostró que se encontraban en el intervalo de pureza adecuado (1.6-2.0) para análisis posteriores.

El RNA total se utilizó para la síntesis del cDNA. Posteriormente, se realizó la PCR de punto final para determinar la síntesis correcta del cDNA obtenido de todas las muestras, siendo así un indicador de la calidad del cDNA sintetizado.

Identificación de los genes de estudio en restos de lactocitos de leche materna.

Se realizó PCR punto final, de los transcritos *GHRL*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOQ*, *FNDC5* e *IGF-1* para identificar si éstos se expresaban en la leche materna, utilizando al gen β -actina como gen de referencia. En seguida, se efectuó una electroforesis en gel de agarosa, con ello se confirmó la obtención de los productos de la reacción, indicando así su validez. Como marcador de peso molecular se usó una escalera de 100pb (pares de bases). A continuación se muestran los resultados obtenidos:

En la figura 6A se presenta la amplificación de los transcritos para β -actina, caseína, α -Lactoalbúmina, *RETN*, *FNDC5*, *ADIPOQ* y en la figura 6B β -actina, *LEP*, *GHRL* e *IGF-1*. Como se observa en la figura 6A, el transcrito de *RETN* y *FNDC5* no se expresa en los restos de lactocitos ya que no se observó amplificación. Por lo contrario, los transcritos de β -actina, Caseína, α -Lactoalbúmina, *ADIPOQ*, *LEP*, *GHRL* e *IGF-1* se expresan en los lactocitos como lo muestran las bandas en la figura 6A y 6B.

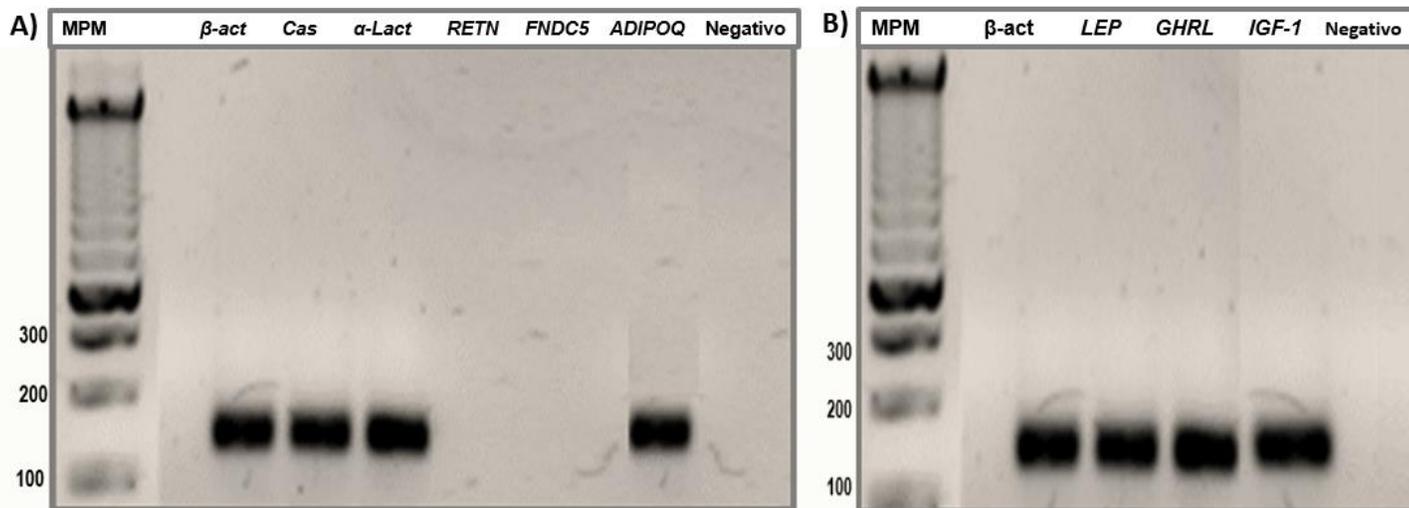


Figura 6. Productos de PCR en gel de agarosa al 2%. **MPM:** marcador de peso molecular 100 pb; **β -act:** β -actina; **Cas:** caseína; **α -Lact:** α -Lactoalbúmina; **RETN:** resistina; **FNDC5:** irisina; **ADIPOQ:** adiponectina; **Negativo:** control negativo; **LEP:** leptina; **GHRL:** grelina; **IGF-1:** factor de crecimiento insulínico tipo 1.

Determinación del perfil de expresión génica de *GHRL*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOQ*, *FNDC5* e *IGF-1* en restos de lactocitos de leche de calostro, de transición y madura.

Para realizar el perfil de expresión génica se llevaron a cabo ensayos de PCR en tiempo real, para esto fue necesario realizar primero curvas de disociación de cada uno de los genes de estudio con el objetivo de determinar la concentración óptima del cDNA a utilizar, verificando cuál de estas concentraciones, favorece la expresión, pudiéndose detectar la señal desde los primeros ciclos.

Las curvas de disociación se realizaron por triplicado para cada uno de los genes de estudio incluyendo *RETN* y *FNDC5* (esto con la finalidad de confirmar la baja expresión debido a que la PCR en tiempo real es una técnica más sensible que la PCR de punto final), con lo cual se corroboró que estos dos genes no se expresan en las células epiteliales provenientes de la glándula mamaria.

Las curvas de disociación se realizaron con el cDNA de calostro, por lo que se diluyó de la siguiente forma: [1:1], [1:10], [1:100], [1:1000] y [1:10000]. Posteriormente, se registraron los ciclos de amplificación (Cq: el ciclo en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal, y se considera el punto en el cual la reacción de amplificación inicia) para seleccionar la concentración óptima del cDNA a utilizar para los análisis posteriores, dicha concentración debe presentar el inicio de detección de la expresión del transcrito a partir del ciclo 20 y hasta el ciclo 35, debido a que en estos ciclos se descarta la contaminación de las muestras o la formación de dímeros.

Finalmente, se determinó que el cDNA sin diluir fue el óptimo para los análisis de expresión de todos los genes. En la figura 7 se presenta a manera de ejemplo, la curva de disociación (marca el inicio de detección de la expresión del transcrito) y la curva *Melt* (indica la temperatura de fusión) obtenidas para *IGF-1*. En este caso para la curva de disociación se obtuvo un Cq = 23.5 y para la curva *Melt* la temperatura de adquisición fue de 80- 85 °C.

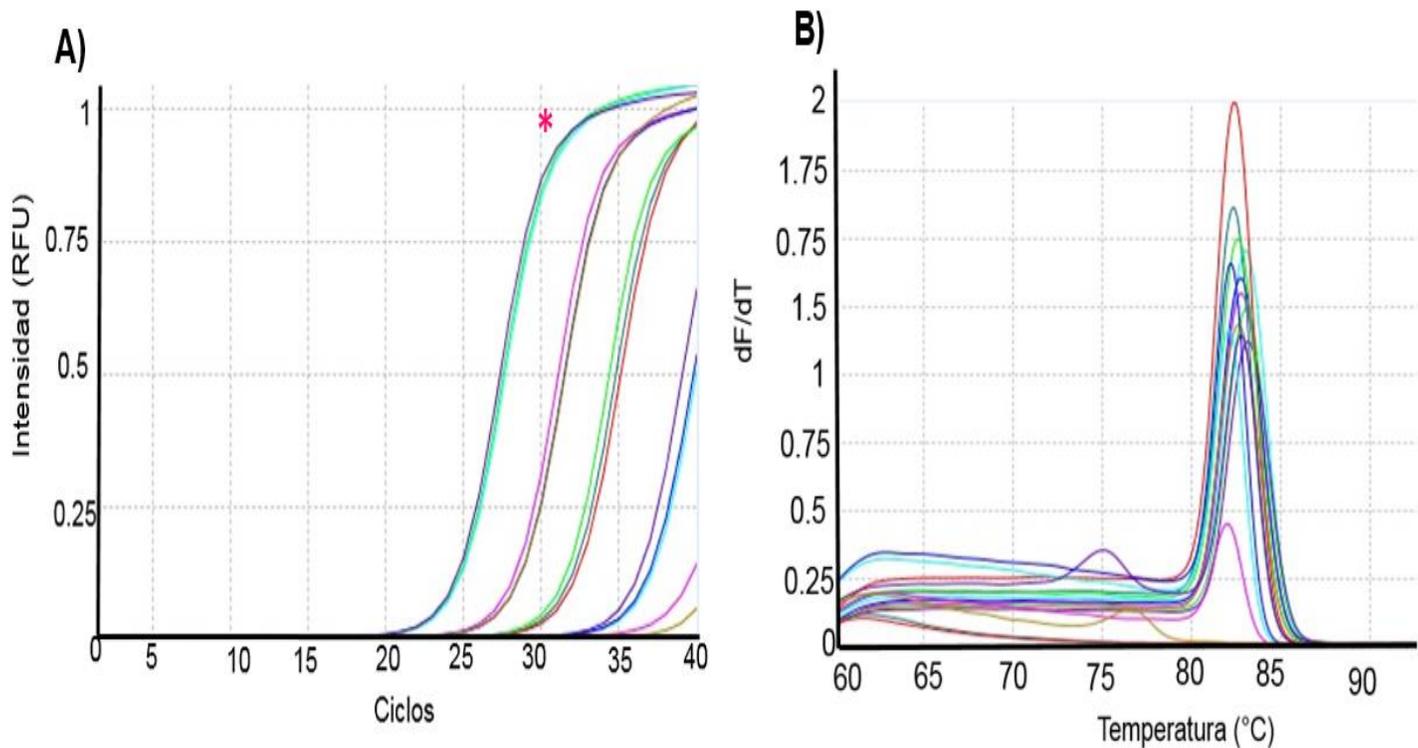


Figura 7. Curvas de disociación de *IGF-1*. **A)** curva de cuantificación (izq. a der. ***[1:1]** Cq=23.5) intensidad de fluorescencia del SYBR Green (RFU) contra el ciclo de amplificación. **B)** curvas de temperatura de fusión obtenida para el fragmento amplificado.

A continuación, se llevaron a cabo las reacciones de PCR en tiempo real por duplicado de los genes *β -actina*, *caseína*, *α -Lactoalbúmina*, *GHRL*, *LEP*, *ADIPOQ* e *IGF-1*. Para analizar los resultados obtenidos, se calculó el promedio de los Cq de cada gen de interés, para normalizar el nivel de expresión de éstos se restó el promedio de Cq del gen *β -actina* de acuerdo al tipo de leche (C, T y M) y como genes específicos del tejido epitelial mamario se usaron *caseína* y *α -Lactoalbúmina*. Finalmente, la expresión de cada uno de los genes se obtuvo con el promedio de las unidades relativas, en el caso de la leche

de transición y la leche madura la expresión se comparó con el calostro. Los resultados en las siguientes figuras se muestran como media \pm error estándar.

La expresión del gen **caseína** de acuerdo al promedio de unidades relativas en la leche de transición (1.19 ± 0.2) y en leche madura (2.72 ± 1.0), se mantuvo constante ($P = 0.75$ y 0.78 , respectivamente) con respecto al calostro (1.32 ± 0.24), como se muestra en la figura 8.

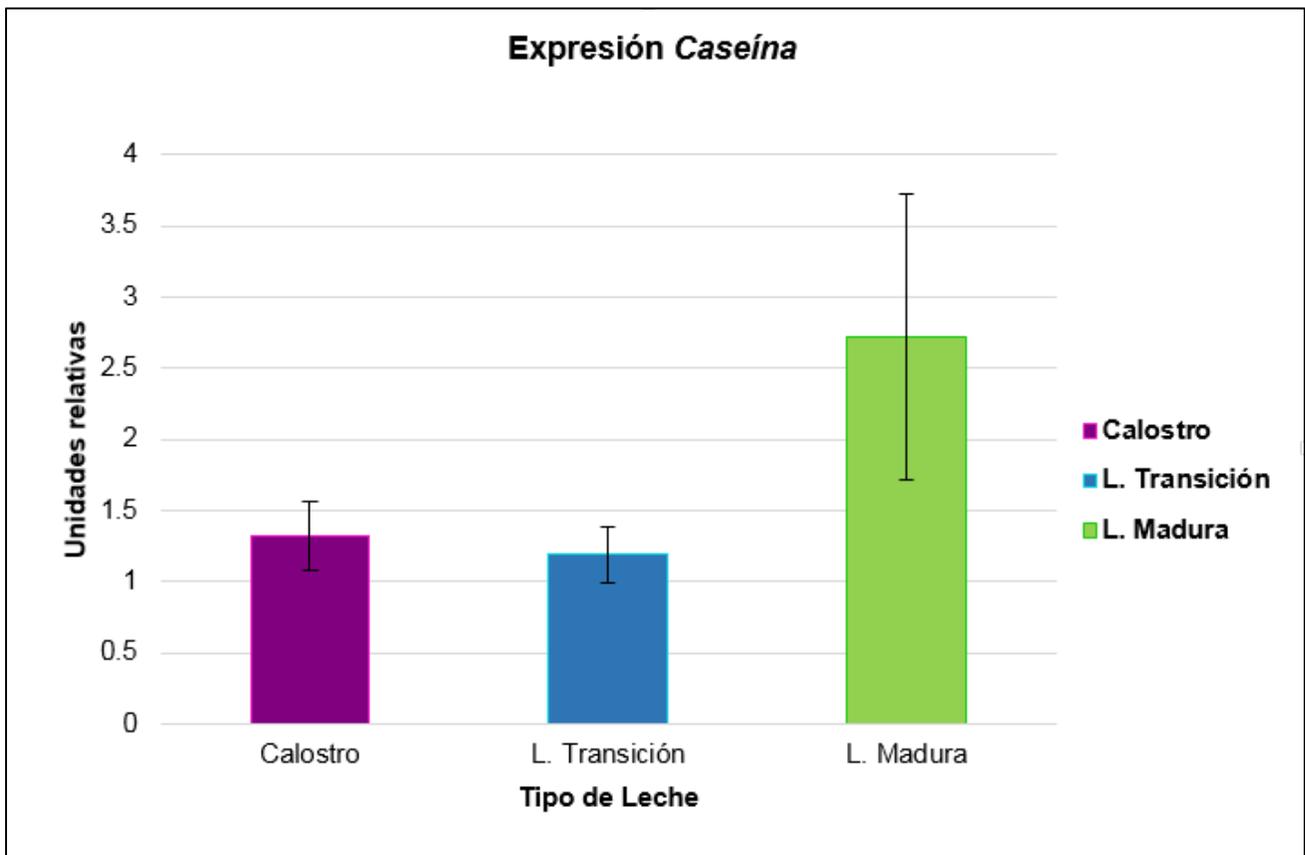


Figura 8. Expresión del transcrito de *Caseína* en restos de células epiteliales presentes en glóbulos de grasa de Calostro, L. Transición y L. Madura. * $P < 0.05$ Prueba de U de Mann Whitney.

Para la expresión del gen **α -Lactoalbúmina** en unidades relativas, los resultados en la figura 9 muestran que la expresión de este gen fue significativamente ($P = 0.002$) mayor en la leche madura (6.43 ± 2.28) con respecto al calostro (1.59 ± 0.43), en contraste con la expresión en la leche de transición (2.17 ± 0.43) ($P = 0.17$) que no se modificó.

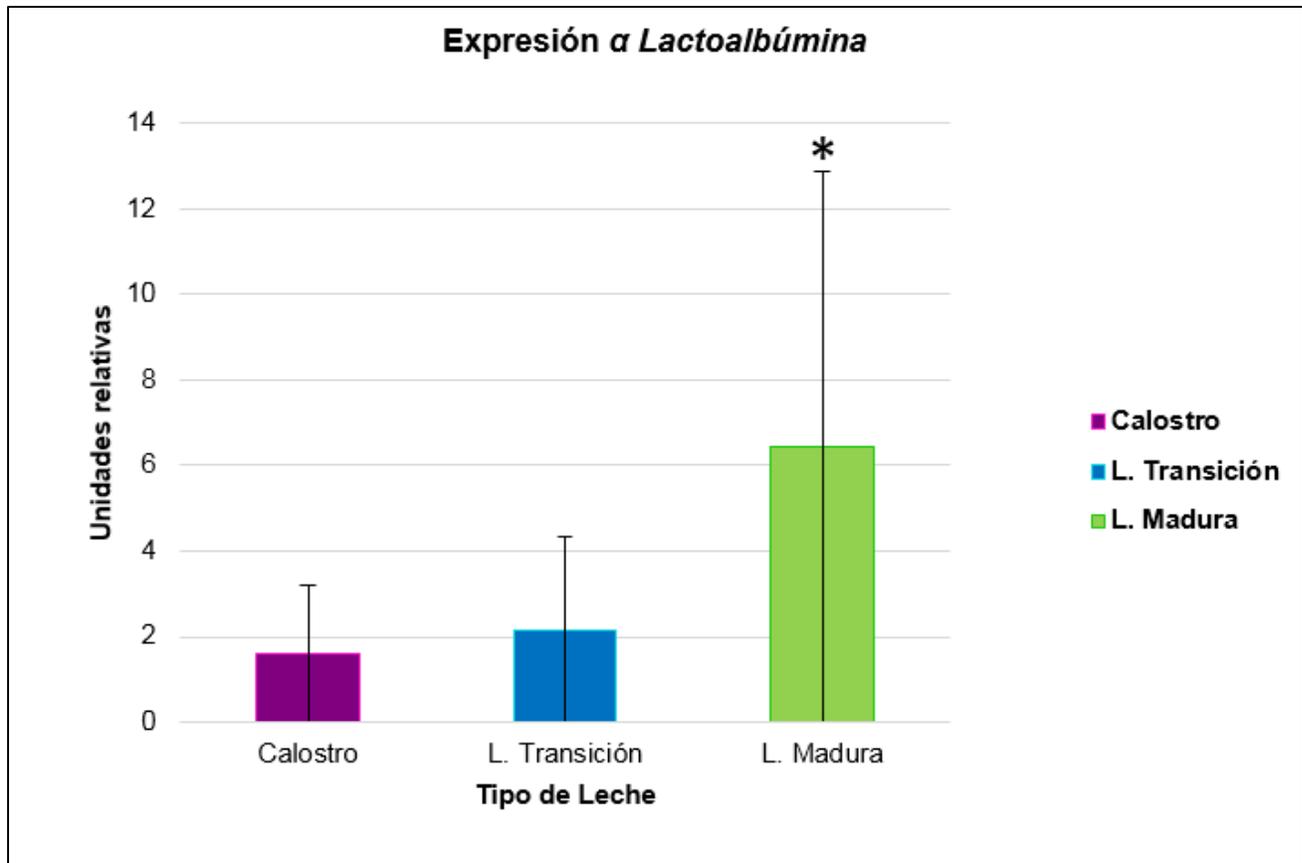


Figura 9. Expresión del gen de α -Lactoalbúmina en restos de células epiteliales presentes en glóbulos de grasa de Calostro, L. Transición y L. Madura. * $P < 0.05$ Prueba de U de Mann Whitney.

En cuanto a la expresión del gen de **GHRL** se mantuvo constante ($P = 0.63$) durante los primeros quince días de lactancia, encontrando que la primera semana se obtuvo un valor de expresión de 1.79 ± 0.55 y en la segunda semana un valor de 0.97 ± 0.29 . Sin embargo, se encontraron diferencias significativas ($P = 0.01$) en la expresión de este gen entre la primera y la cuarta semana (0.39 ± 0.1) de lactancia como se observa en la figura 10.

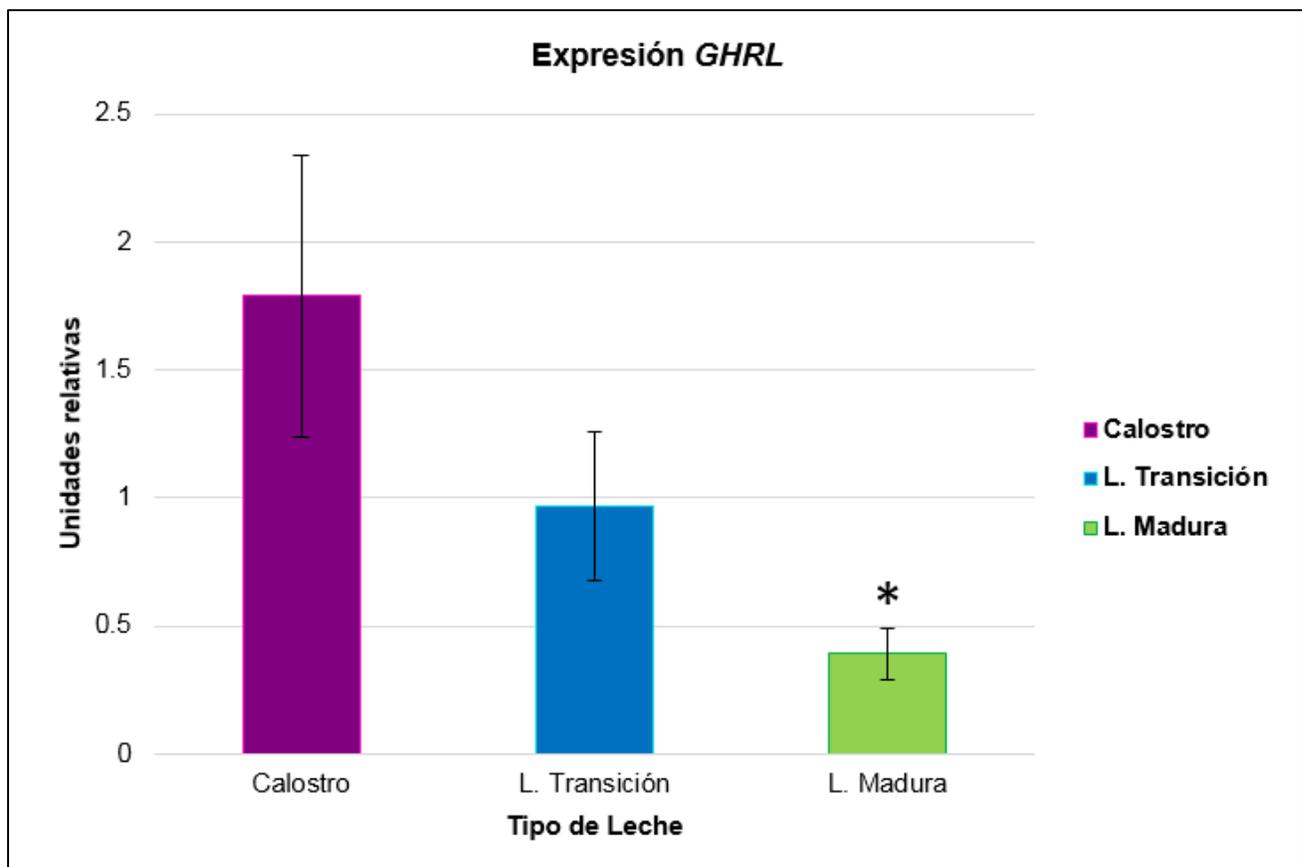


Figura 10. Expresión del gen *GHRL* (grelina) en restos de células epiteliales presentes en glóbulos de grasa de los tres tipos de leche materna. * $P < 0.05$ Prueba de U de Mann Whitney.

Por otra parte, la expresión de **ADIPOQ** se modificó durante el primer mes de lactancia (figura 11), esto se pudo observar al comparar el promedio de las unidades relativas obtenidas de la leche de transición (0.02 ± 0.00) y de la leche madura (0.4 ± 0.11), con respecto al calostro (1.27 ± 0.19), observándose diferencias significativas para ambos casos ($P = 0.001$).

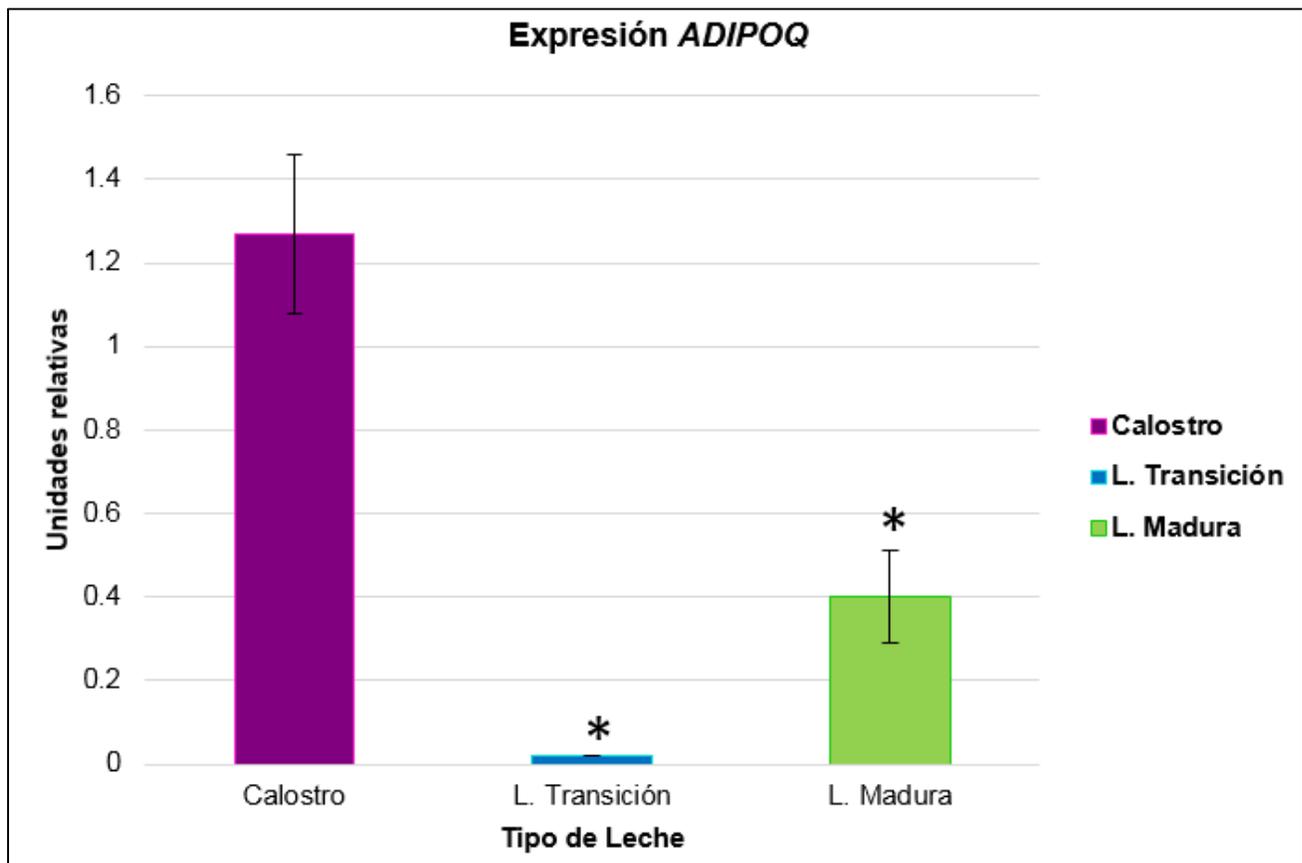


Figura 11. Expresión del gen de *ADIPOQ* (adiponectina) en restos de células epiteliales presentes en restos de glóbulos de grasa de los tres tipos de leche humana. * $P < 0.05$ Prueba de U de Mann Whitney.

Respecto a la expresión de **LEP** (figura 12), no se observaron diferencias significativas en el promedio de las unidades relativas correspondientes a la leche de transición (1.19 ± 0.34) ($P = 0.41$) y la leche madura (0.88 ± 0.28) ($P = 0.93$) comparadas con la expresión en el calostro (1.53 ± 0.42).

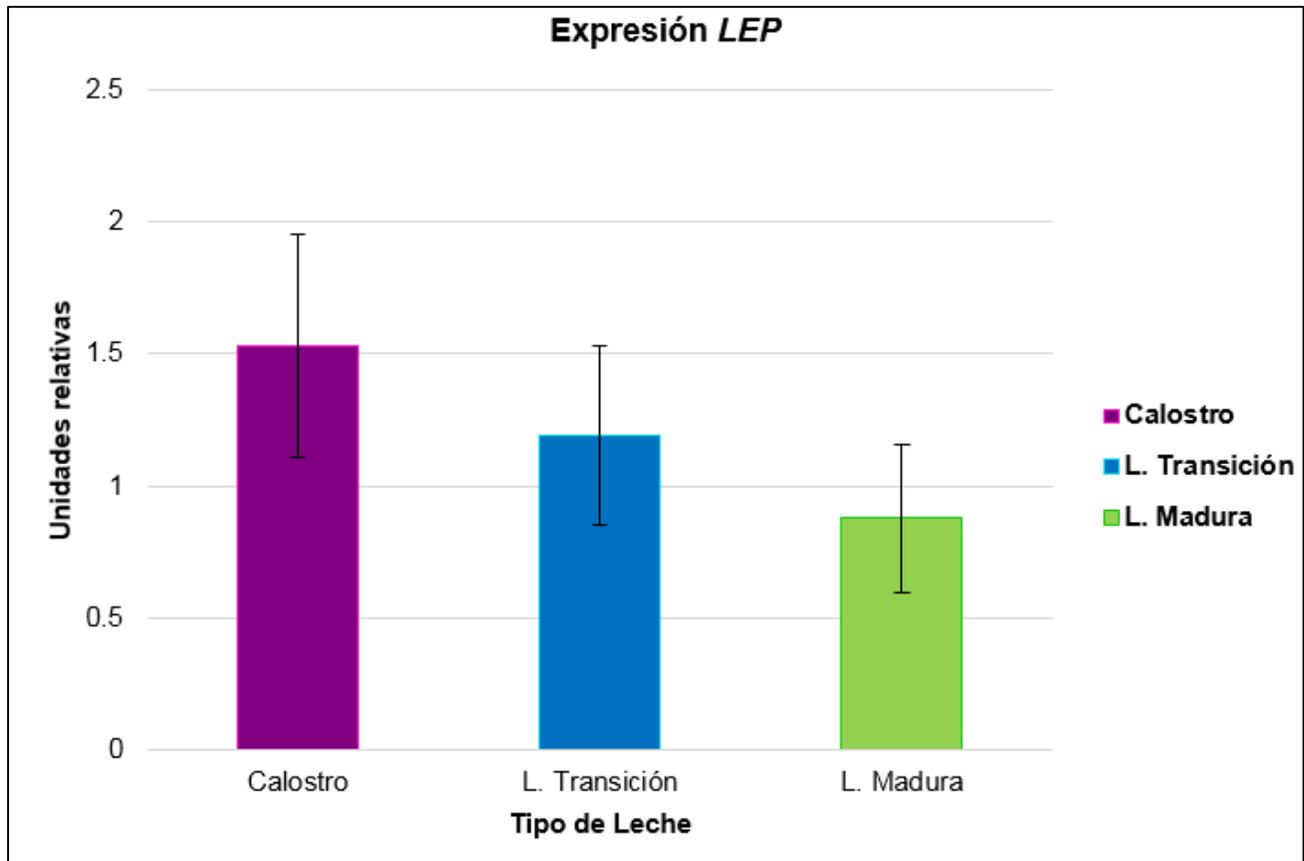


Figura 12. Expresión de **LEP** (leptina) en restos de células epiteliales presentes en glóbulos de grasa de los tres tipos de leche materna. * $P < 0.05$ Prueba de U de Mann Whitney.

Finalmente, observamos resultados interesantes a cerca de la expresión de **IGF-1** en las células epiteliales mamarias, la expresión de este se detectó en un intervalo del ciclo 24 al 26 durante la primera, segunda y cuarta semana de lactancia, lo cual indica una expresión alta ya que los ciclos de detección de la expresión (Cq) fueron similares a los observados para el gen *Caseína* (Cq = 21-22). Adicionalmente, la expresión de este transcrito se mantuvo estable, ya que al comparar la expresión de la segunda (1.32 ± 0.43) y la cuarta semana (1.1 ± 0.37) con respecto a los primeros 5-7 días de lactancia (1.4 ± 0.28), se obtuvo un valor de $P = 0.63$ y $P = 0.22$ respectivamente, descartando así diferencias significativas (figura 13).

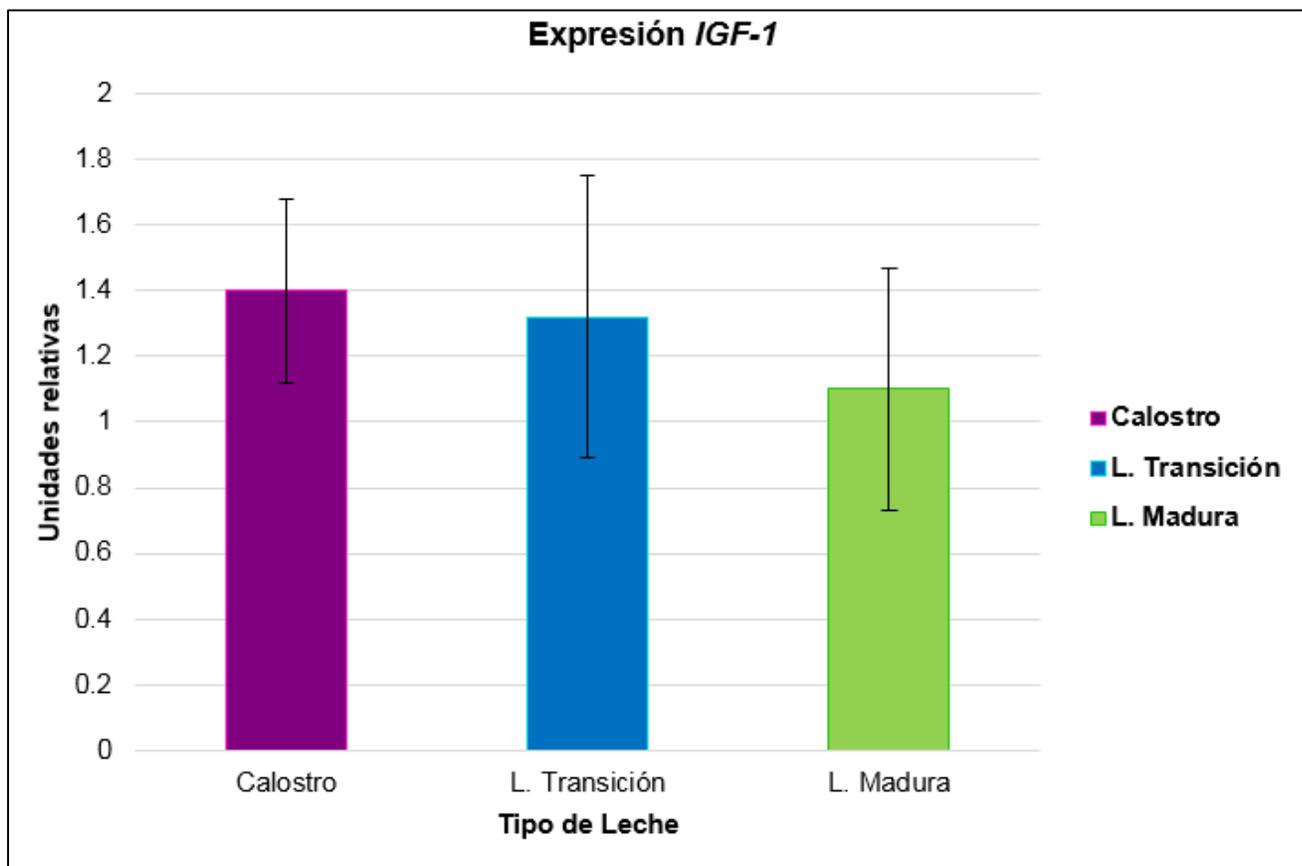


Figura 13. Expresión del gen *IGF-1* en células epiteliales presentes en restos de células epiteliales de glóbulos de grasa de los tres tipos de leche humana. * $P < 0.05$ Prueba de U de Mann Whitney.

8. DISCUSIÓN

Este estudio tuvo como objetivo determinar tanto la expresión como los cambios de ésta de los genes *GHRL*, *RETN*, *LEP*, *ADIPOQ*, *FNDC5* e *IGF-1* en restos lactocitos presentes en calostro, leche de transición y leche madura de mujeres.

Primeramente los resultados demuestran que el cDNA obtenido provenía de tejido epitelial mamario ya que se observó la expresión del gen *caseína* y α -*Lactoalbúmina*, los cuales fueron reportados por Hall y colaboradores en 1982 como genes de tejido específico para dicho órgano, los cuales durante la lactancia, su expresión se modula en las células epiteliales de la glándula mamaria mediante una combinación de hormonas peptídicas y esteroides, de acuerdo a lo mencionado por Baneerje en 1976.

En cuanto al transcrito α -*Lactoalbúmina*, los resultados demuestran mayor expresión de éste gen en la leche madura con respecto al calostro, lo cual se sustenta con la demanda del lactante, ya que α -*Lactoalbúmina* constituye la principal fuente de aminoácidos necesarios para el desarrollo de células y tejidos (UNICEF, 2016). Por lo que, los resultados sugieren que se requiere mayor expresión del gen α -*Lactoalbúmina* en la leche materna posiblemente para hacer frente a la demanda que impone el neonato para su desarrollo (Heine *et al.*, 1991; Lönnerdal, 2016). Por lo contrario, la expresión del gen *caseína* no se modificó durante el primer mes de lactancia, no obstante se hubiera esperado mayor expresión en la leche madura con respecto al calostro, puesto que a medida que el lactante se desarrolla requiere mayor aporte proteico, y la *caseína* es uno de los componentes proteicos en mayor proporción (40% aproximadamente) de la leche materna además de actuar como modulador exógeno de la motilidad gastrointestinal y permeabilidad intestinal (Calixto *et al.*, 2011). Se sugiere que las razones por las que no

se encontraron cambios en la expresión del gen *Caseína* podrían estar involucrados a la fisiología gastrointestinal del lactante, debido a que favorece la digestión de proteínas a través de las casomorfina (péptidos de 4-10 aminoácidos derivados de la caseína) (Baró *et al.*, 2001); lo que nos llevaría a plantear que esta expresión se mantiene en la glándula mamaria para que la secreción de caseína en la leche materna sea continua y así el lactante pueda obtener los beneficios antes referidos.

Sin embargo, debemos considerar que posiblemente no se encontraron cambios debido a que el número de mujeres que participaron en el estudio es bajo, por lo que se requiere un mayor número de participantes para confirmar este resultado.

Para los transcritos de estudio, esta investigación reporta que tanto el gen *GHRL* como el de la *LEP* se expresan en los restos de lactocitos proveniente de los tres tipos de leche (calostro, leche de transición y leche madura). Nuestros hallazgos son apoyados con los obtenidos por otros autores. En el caso de *GHRL*, Gnanapavan y colaboradores en el 2002, reportaron que este gen se expresa en tejido epitelial mamario humano (*post mortem*). Asimismo, Smith y colaboradores en 1998, concluyen que el transcrito de *LEP* se expresa en cultivos celulares epiteliales, provenientes de la glándula mamaria humana. Sin embargo, estos dos estudios no proporcionan información si existen cambios en la expresión de dichos genes en el tejido mamario durante la etapa de lactancia.

Otro hallazgo importante fue la identificación de los genes *ADIPOQ* e *IGF-1* en el tejido epitelial mamario, ya que hasta nuestro conocimiento no existen reportes acerca de expresión de estos transcritos en dicho tejido humano. Aunque el único estudio referido a la expresión de estos genes específicamente de *ADIPOQ* fue el reportado por Othani y

colaboradores en el 2011, los autores reportaron la expresión del gen en la glándula mamaria de rumiante.

Finalmente, dentro de los hallazgos obtenidos, se encontró que tanto *RETN* como *FNDC5* no se expresan en el tejido epitelial mamario humano. Aunque estas hormonas resistina e irisina se secretan en la leche materna, de acuerdo a lo reportado por Ilcol y colaboradores en el 2008 y Aydin y colaboradores en el 2013 respectivamente, su síntesis no proviene de la glándula mamaria, pero sí de otros tipo de órganos o tejidos como el tejido adiposo blanco, y es a través del torrente sanguíneo que llegan a la glándula mamaria para su transporte hacia la leche materna (Boström *et al*, 2012; Nogueiras *et al*, 2005).

Es importante considerar que actualmente no se han realizado estudios que expliquen el cambio en la expresión de los genes *GHRL*, *LEP*, *ADIPOQ* e *IGF-1*, en el tejido glandular mamario durante la lactancia, ya que como se ha referido con anterioridad para alguno de ellos no estaba reportada su síntesis en este órgano. No obstante, diversos autores relacionan la concentración de las hormonas grelina, leptina, adiponectina e IGF-1 en la leche materna con la demanda nutricia y con la maduración gastrointestinal y endócrina del lactante (Gridneva *et al.*, 2017). Debido a que estas hormonas participan en el control de la ingesta de alimentos, se ha propuesto que también regulan el apetito del neonato, mientras el sistema endocrino y tracto gastrointestinal maduran por completo y ejercen sus funciones, facilitando tanto la secreción de hormonas como la absorción de nutrimentos (proteínas, hormonas entre otros) (Badillo *et al.*, 2017). Esta hipótesis se ha propuesto ya que la síntesis de hormonas en el neonato, se lleva a cabo de forma óptima a partir de las primeras dos semanas de nacimiento (Bouret y Simerly, 2006).

Es por ello que en la presente investigación se sugiere que la expresión de los genes como *GHRL*, *ADIPOQ*, *LEP* e *IGF-1* en las células epiteliales mamarias, pudiera estar relacionada con la fisiología endocrina y gastrointestinal del lactante, dadas las funciones que presentan las hormonas codificadas por estos genes; cuyas concentraciones se ven modificadas en los tres tipos de leche, debido a mecanismos reguladores neuroendocrinos (Badillo *et al.*, 2017). El transcrito *GHRL* codifica para la hormona grelina, su principal función es causar los movimientos peristálticos del intestino promoviendo la ingesta de alimento y la secreción de ácido gástrico (Campos *et al.*, 2006). Nuestros resultados demuestran que la expresión de *GHRL* fue menor en la leche madura con respecto al calostro, esto podría estar relacionado con lo descrito por Olivera y colaboradores en el 2014, quienes determinaron por inmunohistoquímica en tejidos del tracto gastrointestinal de lactantes, que la secreción en la mucosa gástrica de la hormona grelina era mayor en el recién nacido a partir del día treinta de nacimiento. La mayor cantidad de grelina del neonato en el tracto gastrointestinal podría influir en una menor demanda y menor secreción en la leche influyendo en la disminución en la expresión del transcrito en las células epiteliales mamarias en el primer mes postparto, sugiriendo que el neonato es capaz de sintetizar su propia grelina requiriendo así menos grelina exógena.

Por otra parte, el gen *ADIPOQ* es el encargado de sintetizar adiponectina, hormona que presenta actividades antiinflamatorias además de estimular cambios en el apetito, favoreciendo tanto al apetito como a la saciedad (Domínguez, 2007). La expresión de este gen disminuyó a medida que se produjo leche madura. Los cambios observados en la expresión en el gen *ADIPOQ* podrían estar relacionados con la función antiinflamatoria

de adiponectina sobre las células epiteliales de la mucosa intestinal en el lactante, siendo un factor protector ante la degradación de proteínas a través del proceso de digestión, además de favorecer la regulación de la ingesta alimenticia del recién nacido al ser absorbida a través de la mucosa intestinal (Newburg *et al.*, 2010). Por lo que se sugiere que la expresión del gen disminuye a medida que el lactante crece sintetiza su propia adiponectina en algunos órganos o tejidos, como el tejido adiposo (Domínguez, 2007) requiriéndola en menor cantidad en la leche materna (Savino *et al.*, 2009).

En cuanto al gen *LEP* que codifica para la leptina, hormona encargada de inhibir el apetito (Savino *et al.*, 2005). Se observó durante el presente estudio que la expresión se mantuvo constante durante el primer mes de lactancia. Por lo cual la expresión constante del gen podría estar relacionada a que el lactante requiere la hormona de forma exógena a través de la leche, estimulándolo a mantener la señal de saciedad durante los primeros días de vida, ya que existe la posibilidad de que el número de receptores en el estómago del recién nacido sea bajo, o que las neuronas hipotalámicas no estén completamente maduras para que el recién nacido pueda secretar su propia leptina. (Gridneva *et al.*, 2017; Badillo *et al.*, 2017).

Finalmente, el gen *IGF-1* que codifica para la hormona con el mismo nombre aún no tiene una función tan específica en la glándula mamaria, sin embargo, algunos autores proponen que participa en el crecimiento y ganancia de peso neonatal (Kon *et al.*, 2014). En la presente investigación, la expresión de este gen en las células epiteliales mamarias se mantuvo elevada, aunque sin cambios significativos durante el primer mes posparto. Lo cual podría estar acorde con lo propuesto por Goldman en el 2000, quien propone que los factores de crecimiento están presentes en la leche materna para contribuir a la

maduración del tracto gastrointestinal y al desarrollo de la mucosa intestinal del lactante ya que hay evidencia en modelos animales donde los factores de crecimiento favorecieron el desarrollo y maduración del tracto gastrointestinal. Esta propuesta podría estar referida a que durante los primeros días de nacimiento, la cantidad de factores de crecimiento producidos por el neonato son insuficientes, requiriéndolos de fuentes exógenas como la leche materna (Savino *et al.*, 2005).

Por lo anteriormente mencionado se considera que la expresión de los genes *GHRL*, *LEP*, *ADIPOQ* e *IGF-1*, podría estar relacionada con la concentración de las hormonas grelina, leptina, adiponectina e IGF-1 en leche materna y a su vez con la fisiología gastrointestinal y endócrina del lactante, participando en mecanismos de programación del apetito. Sin embargo, se requieren estudios que determinen el tipo de asociación entre estos factores.

9. CONCLUSIONES

- Los transcritos *GHRL*, *LEP*, *ADIPOQ* e *IGF-1* se expresan en los restos de lactocitos.
- Los RNAm de los genes *RETN* y *FNDC5* no se expresan en los restos de células epiteliales mamarias.
- La expresión génica de *ADIPOQ* y *GHRL* en los restos de lactocitos, disminuye a medida que se produce leche madura
- La expresión génica de *LEP* en los lactocitos es similar cuando se produce calostro, leche de transición y leche madura.
- El gen *IGF-1* tuvo una expresión alta durante el primer mes de lactancia. Sin embargo, esta expresión no se modificó cuando se produce calostro, leche de transición y leche madura.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar J. (2005). Conceptos, definiciones e historia de la lactancia. En A. J (Ed.), *Lactancia Materna* (pp. 1–13). España: Elsevier.
2. Aguilar J. y Villaverde C. (2005). Fisiología de la glándula mamaria. En A. J (Ed.), *Lactancia Materna* (pp. 38–50). España: Elsevier.
3. Arango A. (2005). Lactancia natural. En R. H. Posada A., Gómez J. (Ed.), *El niño sano* (pp. 290–300). Colombia: Panamericana.
4. Aydin S., Aydin S., Ozkan Y., Kumru S. (2006). Ghrelin is present in human colostrum, transitional and mature milk. *Peptides*, 27(4), 878–882.
5. Aydin S., Kuloglu T., Aydin S. (2013). Copeptin, adropin and irisin concentrations in breast milk and plasma of healthy and those with gestational diabetes mellitus. *Peptides*, 47, 66–70.
6. Aydin S., Ozkan Y., Erman F. Gurates B., Kilic N., Colak R., Gundogan T., Catak Z., Bozkurt M., Akin O., Sen Y., Sahn I. (2008). Presence of obestatin in breast milk: relationship among obestatin, ghrelin, and leptin in lactating women. *Nutrition*, 24(7–8), 689–693.
7. Badillo S., Rodríguez M., Nieves X. (2017). Impact of metabolic hormones secreted in human breast milk on nutritional programming in childhood obesity. *J Mammary Gland Biol*, 1(22):1-21.
8. Baneerje M. (1976). Responses of mammary cells to hormones. *Int Rev Cytol*, 47, 3-90.
9. Barbosa L., Butte N., Villalpando S., Wong W., Smith O. (1997). Maternal energy balance and lactation performance of Mesoamerindians as a function of body mass index. *Am J Clin Nutr*, 66, 575–583.

10. Baró L., Jiménez J., Martínez- A., Bouza J. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con actividades funcionales. *Ars Pharmaceutica*, 42(3), 135-145.
11. Becerra F., Bonilla L., Rodríguez J. (2015). Leptina y lactancia materna: beneficios fisiológicos. *Rev Fac de Med*, 63(1), 119–126.
12. Boström P., Wu J., Jedrychowski M., Korde A., Ye L., Lo J., Rasbach K., Boström E., Choi J., Long J., Kajimura S., Zingaretti M., Vind B., Tu H., Cinti S., Højlund K., Gygi S. (2012). A PGC- α - dependent myokine that drives Brown-fat- like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481, 463–468.
13. Bouret S. y Simerly R. (2006). Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clin Genet*, 70(4): 295-30.
14. Boutinaud M, Guinard J., Jammes H. (2004). The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod Nutr Dev*, 44, 499–508.
15. Broker B. (1980). The epithelial cells and cell fragments in human milk. *Cell Tissue Res*, 210, 321-332.
16. Brunner S., Schmid D., Zang K., Much D., Knoeferl B., Kratzsch J. Amman U., Bader B., Hauner H. (2014). Breast milk leptin and adiponectin in relation to infant body composition up to 2 years. *Pediatric Obesity*, 10, 67–73.
17. Calana J. (2008). Fisiología de la lactancia. In P. C. Aguayo J., Gómez A., Hernández T., Lasarte T., Lozano J. (Ed.), *Manual de Lactancia Materna de la teoría a la práctica* (Panamerica, pp. 61–66). España.
18. Calixto R., González A., Bouchan P., Paredes Y., Vázquez S., Cébulo A. (2011). Importancia clínica de la leche materna y transferencia de células inmunológicas al neonato. *Per Reprod Hum*, 25(2), 109–114.

19. Campos M., Aguilera M. Cañete R., Gil A. (2006). Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Brit Journal of Nutr*, 96, 201–226.
20. Casabiell X., Piñeiro V., Tomé M., Peinó R., Dieguez C., Casanueva F. (1997). Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(12), 4270–4273.
21. Casanueva E., Kaufer M., Pérez A. (2009). Nutriología médica. In *Nutrición en el primer año de vida*. (3era ed., p. 63). México: Panamericana.
22. Çatli G., Dundar N., Dünder B. (2014). Adipokines in Breast Milk: An Update. *Clin Res Pediatr Endocrinol*, 6(4), 192–201.
23. Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156–159.
24. Domínguez C. (2007). Adiponectina: el tejido adiposo más allá de la reserva inerte de energía. *Rev Endoc Nutr*, 15(3), 149–155.
25. Gnanapavan S., Kola B., Bustin S., Morris D., McGee P., Fairclough P., Bhattacharya S., Carpenter R., Grossman A., Korbonits M. (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(6), 2988–2991.
26. Gridneva Z., Sambavi K., Hepworth R., Wan J., Lai T., Ward C., Hartmann E., Geddes T. (2017). Effect of Human Milk Appetite Hormones, Macronutrients, and Infant Characteristics on Gastric Emptying and Breastfeeding Patterns of Term Fully Breastfed Infants. *Nutrients*, 9(15), 1-21.

27. González E. y Rio J. (2012). Regulación de la ingesta alimentaria y del balance energético; factores y mecanismos implicados. *Nutr Hosp*, 27, 117–126.
28. Goldman A. (2000). Modulation of the Gastrointestinal Tract of Infants by Human Milk. Interfaces and Interactions. An Evolutionary Perspective. *J Nutr*, 113(2), 426-431.
29. Guerra de Almeida J. (2008). La leche humana: un híbrido biológico-social. En P. C. Aguayo J., Gómez A., Hernández T., Lasarte T., Lozano J. (Ed.), *Manual de Lactancia Materna de la teoría a la práctica*. (pp. 68–72). España: Panamericana.
30. Hall L., Emery D., Davies M., Parker D., Craig R. (1982). Organization and sequence of the human α -lactalbumin gene. *J Biochem*, 242, 735-742.
31. Heine W., Klein P., Cañas P. (1991). La importancia de alfa-lactoalbúmina en la nutrición infantil. *J Nutr*, 121(3), 277-283.
32. Hovey R., Trorr J., Vonderhaar B. (2002). Establishing a Framework for the Functional Mammary Gland: From Endocrinology to Morphology. *J Mammary Gland Biol*, 7(1), 18–31.
33. Ilcol Y., Hizli Z., Ozcan T. (2006). Leptina concentration in breast milk and its relationship to duration of lactation and hormonal status. *Int Breastfeed J*, 1(21), 1–9.
34. Ilcol Y., Hizli Z., Eroz E. (2008). Resistin is present in human breast milk and it correlates with maternal hormonal status and serum level of C-reactive protein. *Clin Chem Lab Med*, 46(1), 118–124.
35. Jaimes L., Cabrera A., Vilches A., Guzmán C. (2005). Péptidos anorexigénicos y su participación en la conducta alimentaria. *Rev de Pediatr Y Nutr*, 13(2), 67–74.

36. Johnson M. (2010). Anatomy and physiology of the breast. En K. M. Jatoi I. (Ed.), *Management of breast diseases* (pp. 1–36). Berlin: Springer.
37. Kierson J., Dimatteo D., Locke R., Mackley A. (2006). Ghrelin and cholecystokinin in term and preterm human breast milk. *Acta Paediatr*, 95, 991–995.
38. Kierszenbaum A. (2008). Glándulas epiteliales. In *Introducción a la anatomía patológica* (pp. 58–61). España: Elsevier.
39. Komatsu T., Itoh F., Mikawa S., Hodate K. (2003). Gene expression of Resistin in adipose tissue and mammary gland of lactating and non- lactating cows. *Int J Endocrinol*, 178, R1–R5.
40. Kon I., Shilina M., Gmoshinskaya V., Ivanushkina T. (2014). The study of breast milk IGF-1, leptin, ghrelin and adiponectin levels as possible reasons of high weight gain in breast-fed infants. *Nutr Metab*, 65, 317–323.
41. Llamas I., Ruiz L., Llamas M., Rivera E., Sánchez S. (2015). Efectos de la grelina y la obestatina en la salud y la enfermedad. *Rev Med*, 6(3), 196–208.
42. Ley S., Hanley A., Sermer M., Zinman B., O'Connor D. (2012). Associations of prenatal metabolic abnormalities with insulin and adiponectin concentrations in human milk. *Am J Clin Nutr*, 95, 867–874.
43. Lönnerdal B. (2016). Bioactive Proteins in Human Milk: Health, Nutrition, and Implication for Infant Formulas. *J Paediatr*, 173, 4–9.
44. Macías H. y Hinck L. (2012). Mammary gland development. *Rev Dev Biol*, 1(4), 522–557.
45. Macías S., Rodríguez S., Royaine P. (2006). Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia. *Arch Argent Paediatr*, 104(5), 423–430.

46. Mamaria, G. (2016).
<http://www.uaz.edu.mx/histo/morfoembrio/carlson/cap08/cap08.htm>.
47. Maningat C., Sen P., Sunehag L., Hadsell L., Haymont W. (2007). Regulation of gene expression in human mammary epithelium: effect of breast pumping. *Journal Endocrin*, 195, 503–511.
48. Martin L., Woo J., Geraghty, R. (2006). Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. *American Journal of Clin Nutr*, 83, 1106–1111.
49. McManaman J., Revland M., Thrower E. (2006). Secretion and fluid transport mechanisms in the mammary gland: comparisons with the exocrine pancreas and the salivary gland. *J Mammary Gland Biol*, 11, 249–268.
50. Milsom S., Blum W., Gunn A. (2008). Temporal Changes in Insulin-Like Growth Factors I and II in Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins 1, 2 and 3 in Human Milk. *Horm Res*, 69, 307-311.
51. Mobasher A. y Barrett J. (2014). Aquaporin Water Channels in the Mammary Gland: From Physiology to Pathophysiology and Neoplasia. *J Mammary Gland Biol*, 19, 91–102.
52. Mora A., Espinoza A., López N., Acevo P., Romero J., Montero M. (2015). Indicadores de riesgo cardiovascular, patrones de lactancia y estilo de vida de la madre durante el proceso de crecimiento y desarrollo fetal e infantil. *Nutr Clín Y Diet Hospit*, 35(2), 91–100.
53. Newburg D., Woo J., Morrow A. (2010). Characteristics and potential functions of human milk adiponectin. *J Pediatr*, 156(2), S41-S46.
54. Nogueiras R., González C., Mendieta H., Lage R., Diéguez C. (2005). Resistina: una nueva hormona expresada en el tejido adiposo. *Rev Esp Obes*, 3(4), 194–211.

55. Oakes S., Rogers R., N. M. Ormandy C. (2008). Prolactin Regulation of Mammary Gland Development. *J Mammary Gland Biol*, 13, 13–28.
56. Olivera M., Vladan C., Dragoslava D., Mirela B., Sanja V., Tijana S., Milos D., Rastko A. (2014). Ghrelin receptors in human gastrointestinal tract during prenatal and early postnatal development. *Peptides*, 57, 1–14.
57. OMS. (2015). Organización Mundial de la Salud (consultada 18-julio-2016).
58. Othani Y., Yonezawa T., Song S., Takahashi T., Ardiyanti A., Sato K., Hagino A., Roh S., Katoh K. (2011). Gene expression and hormonal regulation of adiponectin and its receptors in bovine mammary gland and mammary epithelial cells. *Journal Ani Sci*, 82, 99–196.
59. Palomer X., Pérez A., Blanco F. (2004). Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Med Clin*, 124(10), 388–95.
60. Rioja Salud. (2010). Rioja Salud. Retrieved from http://www.aeped.es/sites/default/files/8-guia_prof_la_rioja.pdf
61. Savino F., Fissore M., Grassino E., Nani G., Oggero R., Silvestro L. (2005). Ghrelin, leptin and IGF-1 levels in breast-fed and formula-fed infants in the first years of life. *Acta Paediatr*, 94, 531–537.
62. Savino F., Fosspre M., Ligouri S., Oggero R. (2009). Can hormones contained in mothers' milk account for the beneficial effect of breast-feeding on obesity in children? *Clin Endocrinol*, 71, 757–765.
63. Schwartz M. (2003). Central nervous system regulation of food intake. *Obesity*, 14(2):1–8.

64. Smith S., O'connor D., Johnston J., De Lancey E., Hassink S., Funanage V. (1998). Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *Clin End Met*, 83(5), 1810–1813.
65. Stanley T., Meghan N., Feldpausch A., Caitlin A., Murphy B., Steven K., Grinspoon M., Makimura, H. (2014). Discordance of IGF-1 and GH Stimulation Testing for Altered GH Secretion in Obesity. *Growth Horm IGF Res.*, 24(1), 10–15.
66. Stark R., Ashley S., Andrews Z. (2013). AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Mol Cell Endocrinol*, 366(2):215–23.
67. UNICEF. (2016). UNICEF. Retrieved from <http://www.unicef.cl/lactancia/material/index.html> (consultada 18-julio-2016).
68. Velázquez. J. y Huerta R. (2011). La adiponectina y su participación en procesos fisiopatológicos. *Encuentros de La Biología*, 4(134), 41–42.
69. Villalpando S., Butte N., Wong W., Flores S., Hernández M., Smith E., Garza C. (1992). Lactation performance of rural Mesoamerindians. *Eur J Clin Nutr*, 46(5), 337–48.