



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ASOCIACIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES, CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS, FACTORES DE CRECIMIENTO, Y ADIPOCINAS
Y OBESIDAD EN CALOSTRO HUMANO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARICRUZ GONZÁLEZ AGUILAR



CIUDAD DE MÉXICO.

2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Enrique Ortega Soto**

VOCAL: **Profesor: Mario Adán Moreno Eutimio**

SECRETARIO: **Profesor: Ismael Mancilla Herrera**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Octavio Castro Escamilla**

2° SUPLENTE: **Profesor: Alberto García Lozano**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE PROYECTO SE DESARROLLÓ EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA E INFECTOLOGÍA DE LA TORRE DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA “ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES”.

ASESOR DEL TEMA:

DR. EN C. ISMAEL MANCILLA HERRERA

(nombre y firma)

SUSTENTANTE:

MARICRUZ GONZÁLEZ AGUILAR

(nombre y firma)

RESUMEN

La leche materna es la principal fuente de nutrientes y componentes bioactivos necesarios para el desarrollo y defensa de los neonatos e infantes durante sus primeros meses de vida. En los primeros días posteriores al nacimiento, la madre produce el calostro que es rico en componentes bioactivos como células inmunes, citocinas, adipocinas y factores de crecimiento. Recientemente, se describió la presencia de linfocitos T reguladores (Treg) en calostro humano, que se presume contribuyen a modular la tolerancia inmunológica y la respuesta inmune de los primeros retos antigénicos a los que se enfrenta el neonato; la cantidad y fenotipo de este tipo de células puede estar influida por el microambiente en el que se encuentran. Uno de los factores que puede afectar la composición del calostro humano es la obesidad materna, padecimiento caracterizado por altas concentraciones de mediadores proinflamatorios, que repercute importantemente en la salud del infante porque aumenta el riesgo de padecer sobrepeso y obesidad infantil, así como diabetes mellitus tipo II y enfermedades metabólicas y cardiovasculares en la vida adulta. El objetivo de este proyecto fue evaluar si existe asociación entre la obesidad materna y la densidad celular y fenotipo de linfocitos Treg y las concentraciones de citocinas proinflamatorias, adipocinas y factores de crecimiento en calostro humano. A partir de 36 muestras de calostro de mujeres con peso normal, sobrepeso y obesidad se determinaron las densidades celulares de linfocitos Treg y las concentraciones de citocinas proinflamatorias, adipocinas y factores de crecimiento mediante análisis multiparamétricos e inmunoensayos analizados con citometría de flujo. Encontramos que la frecuencia de linfocitos Treg y la concentración de los factores de crecimiento EGF, EPO y FGF-basic se asocian negativamente al IMC, mientras que la concentración de resistina se asocia positivamente a

éste. Estas asociaciones pudieran favorecer un ambiente inflamatorio en el neonato, debido a que se encuentran implicadas en mecanismos relacionados con la obesidad y el estado de inflamación crónica y desequilibrio bioquímico que propicia este padecimiento en la madre puede tener un impacto nocivo en el neonato que recibe el calostro.

ABREVIATURAS

IMC	Índice de masa corporal
OMS	Organización Mundial de la Salud
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPO	Eritropoyetina
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
FGF-basic	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
PDGF-AA	Factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA
PDGF-BB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB
SCF	Factor de células madre
TGF-α	Factor de crecimiento transformante alfa
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
SDG	Semanas de gestación
APC	Célula presentadora de Antígeno

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	
La leche materna.....	1
Composición de la leche materna	3
Componentes solubles de la leche materna.....	3
Componentes celulares de la leche materna.....	5
Factores que afectan la composición de la leche materna.....	13
Obesidad y Lactancia.....	15
PROYECTO	
Justificación.....	19
Pregunta de investigación.....	20
Hipótesis.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	
Diseño de estudio.....	21
Población de estudio.....	21
Obtención de muestras.....	22
Tratamiento preanalítico de muestras.....	23
Inmunomarcaje celular.....	23
Determinación de componentes solubles.....	26
Análisis estadístico.....	27
RESULTADOS	
Características demográficas de la población.....	28
Componente soluble.....	29
Componente celular.....	35
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIÓN	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	55
MATERIAL SUPLEMENTARIO	57

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Principales células presentes en leche materna humana.	5
Figura 2	Diferenciación de linfocitos Th naive a distintas subpoblaciones: Th1, Th2, Th17 y T reg	7
Figura 3	Mecanismos de inmunorregulación de linfocitos Treg.	10
Figura 4	Esquema de causas y consecuencias de malnutrición materno-infantil.	14
Figura 5	Ambiente proinflamatorio en tejido adiposo en obesidad	18
Figura 6	Obtención de calostro humano mediante la técnica de Marmet.	22
Figura 7	Algoritmo de análisis para la identificación de linfocitos Treg en calostro	25
Figura 8	Concentración de resistina en calostro de grupo con obesidad es mayor que grupo peso normal y sobrepeso	33
Figura 9	Porcentajes de poblaciones linfocitarias similares en las tres condiciones evaluadas	35
Figura 10	Expresión de moléculas de superficie asociadas a inmunorregulación en las tres condiciones evaluadas	36
Figura 11	Expresión de moléculas de secreción asociadas a inmunorregulación en linfocitos Treg	37
Figura 12	Tendencia a la disminución en la densidad celular de poblaciones linfocitarias en condición de obesidad	38
Figura 13	Asociación negativa entre la densidad de linfocitos Treg y el IMC materno.	39

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Tinción Superficie para identificación y caracterización de linfocitos Treg.	23
Tabla 2	Anticuerpos para tinción de superficie e intracelular.	24
Tabla 3	Características del Kit para determinar concentraciones de citocinas, adipocinas y factores de crecimiento.	26
Tabla 4	Descripción del universo de estudio.	28
Tabla 5	Comparación de las concentraciones de citocinas evaluadas en los tres grupos de estudio.	29
Tabla 6	Pruebas de correlación entre la concentración de citocinas proinflamatorias y el IMC.	30
Tabla 7	Pruebas de correlación entre la concentración de citocinas proinflamatorias y la densidad celular de Treg.	30
Tabla 8	Comparación de concentraciones de factores de crecimiento en los tres grupos de estudio evaluados.	31
Tabla 9	Pruebas de correlación entre la concentración de factores de crecimiento y el IMC.	32
Tabla 10	Pruebas de correlación entre la concentración de factores de crecimiento y la densidad celular de Treg.	32
Tabla 11	Adiponectina, adipsina y leptina evaluadas en los tres grupos de estudio.	33
Tabla 12	Pruebas de correlación entre la concentración de adipocinas y el IMC.	34
Tabla 13	Pruebas de correlación entre la concentración de adipocinas y la densidad de Treg.	34

INTRODUCCIÓN

La leche materna

La leche materna es un fluido biológico complejo, producido por las glándulas mamarias de la mujer después del parto para proveer nutrientes y protección al neonato e infante en sus primeros meses de vida. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda brindar a los neonatos amamantación exclusiva durante los primeros 6 meses de vida, refiriéndose a ésta como una alimentación libre de otros líquidos, sólidos o vitaminas. Recomienda también la posterior incorporación de alimentos como complemento hasta por un periodo de 2 años, todo esto se reconoce como esencial para la alimentación del neonato e infante[1].

La leche materna es necesaria e insustituible en el período neonatal, un lapso particularmente crítico en el que los neonatos se exponen inmediatamente a una gran cantidad de nuevos retos antigénicos en el ambiente extrauterino, cuando su sistema inmune no está completamente desarrollado y adaptado para brindarles la protección que necesitan. Debido a esto, los recién nacidos e infantes son más propensos a desarrollar enfermedades infecciosas como otitis media, infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, gastroenteritis, sepsis, meningitis, entre otras[2]. Para compensar esta desventaja inmunológica del neonato, la madre le brinda inmunidad pasiva a su descendencia por medio de la placenta y posteriormente con la leche materna[3]. Así, gracias a sus efectos inmunoestimulantes e inmunomoduladores, la leche materna protege contra infecciones tempranas y contribuye a prevenir enfermedades futuras en el recién nacido, tales como enterocolitis necrosante, diabetes mellitus tipo 2, alergias, obesidad, entre otras[4].

La producción de la leche materna es posible gracias a una serie de cambios hormonales que ocurren en la mujer durante el embarazo y el periodo de lactancia. De manera general, la producción de leche ocurre de la siguiente manera: primero, durante el embarazo incrementa la concentración de hormonas como prolactina, que favorecen el crecimiento y desarrollo del tejido mamario, estimulando los lóbulos o células alveolares mamarias en preparación para la producción de leche.

En este periodo a pesar de la presencia de prolactina, la mujer no secreta leche porque la progesterona y el estrógeno, hormonas asociadas al embarazo, bloquean esta acción[5]. Después del parto, los niveles de progesterona y estrógeno disminuyen rápidamente permitiendo que la prolactina estimule la secreción de leche. Cuando el neonato se alimenta, como respuesta a la succión, promueve que en el lóbulo anterior de la glándula pituitaria de la madre se secrete prolactina y en el lóbulo posterior oxitocina. La prolactina secretada continúa estimulando las células alveolares para que la producción de leche no se detenga. Por su parte, la oxitocina promueve que las células mioepiteliales de alrededor de los alvéolos se contraigan, esto tiene como consecuencia que la leche que se ha acumulado en los alvéolos fluya y llene los conductos[6], facilitando la amamantación del neonato, además de estimular la producción continua de leche[7][8]. Adicionalmente, la oxitocina tiene importantes efectos psicológicos, ya que induce un estado de calma, reduce el estrés y aumenta los sentimientos de afecto entre la madre y el neonato, promoviendo un vínculo entre ellos[9].

De acuerdo a su composición y el tiempo en que se genera, la leche materna se clasifica en tres etapas: calostro, leche de transición y leche madura[10]. La mayoría de los componentes de la leche materna se encuentran en altas concentraciones en el calostro y son menos abundantes en la leche madura, puesto que las concentraciones tienden a disminuir y la composición y características de la leche materna se adaptan a las necesidades del neonato[11]. El calostro es el primer fluido producido por la madre inmediatamente después del nacimiento y durante tres a cuatro días posteriores al alumbramiento. Se produce en pequeñas cantidades, alrededor de 40 a 50 mL el primer día, que son suficientes para las necesidades del neonato[12]. Su composición destaca por ser más rico en componentes inmunes que nutricios, ya que contiene gran cantidad de leucocitos y anticuerpos, especialmente de clase IgA, que se han asociado a la protección contra infecciones intestinales y respiratorias, y contiene un mayor porcentaje de proteínas, minerales y vitaminas liposolubles como vitamina A, E y K, que la leche posterior[13]. Es de consistencia viscosa y su color amarillo intenso es indicativo de la alta concentración de carotenoides que contiene, como α -caroteno,

β -caroteno y β -critoxantina. Debido a los beneficios que representa, es imprescindible que el recién nacido reciba calostro desde sus primeras horas de vida[14]. Posterior al calostro se produce la leche de transición cuya producción dura entre cinco y diez días, seguida a esta, de diez a veintiún días después del parto se genera la leche madura que muestra menor variabilidad durante el resto del periodo de lactancia. Durante estas etapas, progresivamente se elevan las concentraciones de lactosa, colesterol, fosfolípidos y vitaminas hidrosolubles; disminuyen las concentraciones de proteínas, leucocitos, inmunoglobulinas y vitaminas liposolubles[15][16].

Composición de la leche materna

La leche materna contiene elementos celulares y solubles que nutren, protegen, y contribuyen a la maduración del sistema inmune, desarrollo de órganos y la colonización por microbiota de los infantes[17, 18]. Los elementos nutricios en la leche materna se encuentran en los siguientes porcentajes: 3% a 5% de lípidos, 0.8% a 0.9% de proteínas, 6.9% a 7.2% de carbohidratos, principalmente lactosa, y 0.2% de minerales[19][20]. Los componentes bioactivos son muy variados y sus actividades biológicas son indispensables para propiciar un óptimo crecimiento y desarrollo del neonato[21].

Componentes solubles de la leche materna

Algunas de las funciones de los componentes solubles son la protección contra patógenos, regulación del ambiente bioquímico, propiciar el desarrollo y crecimiento mediante factores tróficos y participar en mecanismos de regulación del metabolismo en el recién nacido [20][22]. Como ejemplo de estos componentes se encuentran las citocinas proinflamatorias, cuya presencia en leche materna se asocia al proceso de parto, se encuentran en bajas concentraciones y disminuyen conforme transcurre el periodo de lactancia [23][24]. Por ejemplo, IL-6 de la leche materna se encarga de la estimulación de la respuesta de fase aguda y activación de linfocitos B para producción de inmunoglobulinas[25][26][27], la IL-8 contribuye al reclutamiento y tráfico de leucocitos, como neutrófilos, en la leche humana y contribuye a la maduración del epitelio intestinal neonatal, modulando así el

sistema inmunológico del recién nacido[28][25, 29], y la IL-10 reprime la inflamación causada por el perfil Th1 e induce la producción de anticuerpos favoreciendo la tolerancia en el recién nacido [30][31][27]. Las citocinas también pueden actuar en conjunto para conseguir una determinada respuesta, por ejemplo, las subpoblaciones de linfocitos T *helper*, mediante la producción y liberación de citocinas son capaces de iniciar, perpetuar y regular la magnitud de la respuesta inmune[32]. Como componentes solubles en la leche materna, los factores de crecimiento también juegan un papel importante. Por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) propicia la estimulación, proliferación y maduración de células epiteliales del tracto gastrointestinal del recién nacido, la eritropoyetina (EPO), además de contribuir al desarrollo intestinal, actúa como un importante regulador de la eritropoyesis al promover la proliferación y diferenciación de las células progenitoras eritroides[33], el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) promueve angiogénesis y reparación tisular en el neonato y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) funciona como un factor trófico en los intestinos del recién nacido[34]. La leche materna también contiene adipocinas como adiponectina, una adipocina antiinflamatoria que ayuda a la reducción y control del índice de masa corporal (IMC) del recién nacido[35, 36], leptina que contribuye a la regulación del almacenamiento energético, apetito e IMC neonatal[37-39] y resistina que participa en la regulación de la sensibilidad a la insulina y el mantenimiento de la homeostasis metabólica del neonato[38][40]. La producción de adipocinas por parte de los adipocitos se ve afectada por factores como hipoxia, estrés oxidativo y factores proinflamatorios, así como por presencia de citocinas como TNF e IL-6 [41][42]. La expresión desregulada de estos componentes causada por el exceso de adiposidad y la disfunción de los adipocitos, se ha relacionado con la patogénesis de diversos procesos de enfermedad a través de respuestas inmunes alteradas[42][43]. Estos componentes solubles con actividad biológica son transferidos de la madre al neonato mediante la leche materna y suelen verse modificados en términos de concentración por condiciones fisiológicas y estados de salud de la madre, razón de la importancia de su estudio sobre la repercusión de estos cambios en el neonato.

Componentes celulares de la leche materna

Además de componentes solubles, en la leche materna se transfieren células epiteliales, células madre, leucocitos y probióticos[44]. En la Figura 1 se muestra un esquema en el que se observa, a modo de resumen, la composición celular de la leche humana. Primero tenemos al grupo de bacterias probióticas que la madre transfiere al recién nacido, razón por la que el calostro y la leche materna funcionan como fuentes continuas de bacterias benéficas y comensales para el intestino de los neonatos e infantes, que ingieren aproximadamente entre 1×10^5 y 1×10^7 bacterias por día [45]. Algunas de las células derivadas de la mama son lactocitos, células mioepiteliales, células progenitoras y células madre. Entre las células de origen hematopoyético se encuentran células madre hematopoyéticas y leucocitos, tales como: linfocitos T, linfocitos B, células NK, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. Estas células tienen la capacidad de proteger al neonato mientras éste termina de desarrollar su propio sistema inmune[44] .

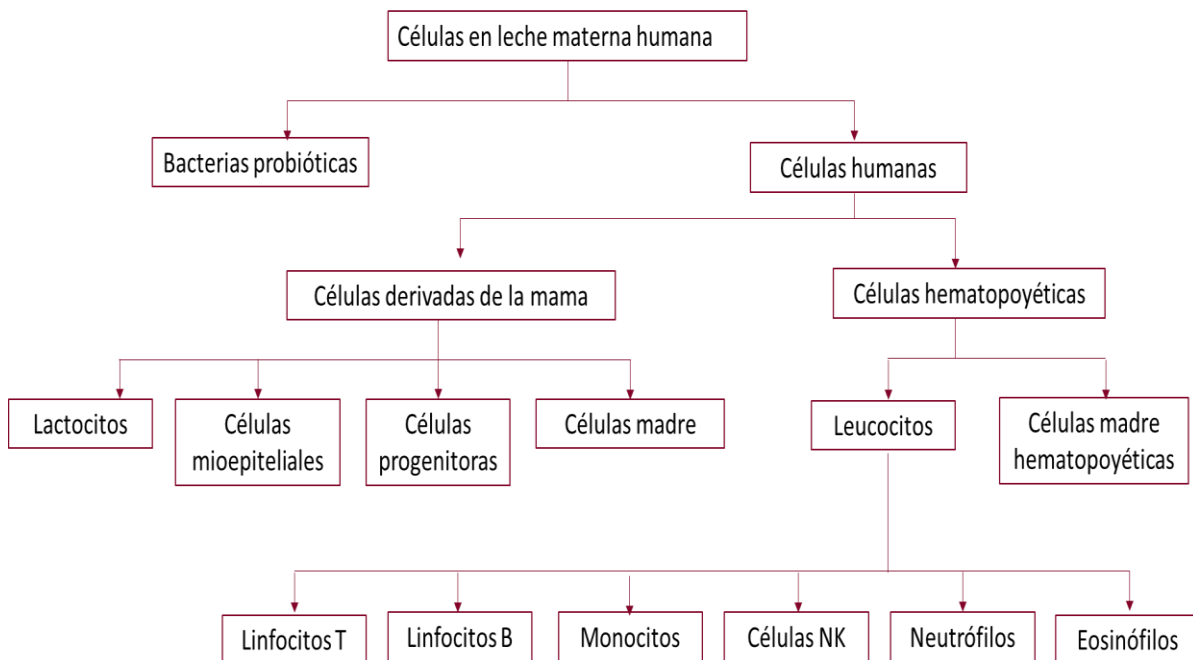


Figura 1. Principales células presentes en leche materna humana. La leche humana contiene probióticos y células provenientes de la madre, tanto derivadas del seno materno como derivadas de linaje hematopoyético, en donde se incluyen células inmunes con importantes funciones de protección que transfiere la madre al neonato. Modificado de: Witkowska-Zimny, 2017.

En diversos estudios se ha mostrado que los leucocitos transferidos por medio de leche materna son capaces de establecerse en el intestino del lactante, particularmente en las placas de Peyer [46]. Así, a diferencia de otras secreciones, la leche materna contiene leucocitos viables que se trasladan de la madre al neonato, proporcionan inmunidad activa y promueven el desarrollo de la inmunocompetencia en el recién nacido[47][48][49]. Para que esto sea posible, los leucocitos migran a la mama a través de vasos linfáticos y circulación sistémica[50], desde donde se presume entran al lumen de los alvéolos a través de la vía paracelular[47]. Adicionalmente, estudios funcionales han demostrado diferencias entre leucocitos en leche materna y en circulación sanguínea [51][52][53], lo que sugiere una migración selectiva de leucocitos de la circulación a la leche materna y/o alteraciones selectivas de las propiedades de los leucocitos mientras se encuentran en el seno materno. Lo cual resulta ser importante para su transferencia y posteriores funciones en el neonato[54][47]. Por ejemplo, se ha reportado que los linfocitos T CD4+ en la leche materna están presentes en un estado activado y tienen fenotipo de memoria, con lo que contribuyen con mayor eficiencia a la protección del neonato. De este modo, los linfocitos T activados de origen materno compensan la función inmadura de los linfocitos T neonatales y promueven su maduración[55], y por medio de estas células, la madre brinda protección pasiva al neonato transfiriéndole sus experiencias antigénicas[56][57][47].

Dentro de las células totales en calostro humano, los linfocitos representan del 13 al 20%[58, 59], y se consideran el tipo de leucocito más frecuente en este fluido[44]. Las tres principales subpoblaciones de linfocitos T en leche materna son: linfocitos T, linfocitos B y células NK [60][61]. Los porcentajes correspondientes a estas poblaciones en leche materna son los siguientes: linfocitos T:83% dentro del cual, los linfocitos T CD4+ y T CD8+ representan el 45.6% y 29.8%, respectivamente[17]. Células T $\gamma\delta$ +:11%, linfocitos B:2%, y células NK:3-4%[62][63][64].

La subpoblación celular que predomina en leche materna son los linfocitos T *helper* o cooperadores (T CD4+) [65][66], los cuales son capaces de desempeñar diferentes funciones en el neonato. La activación de estos linfocitos T *helper* (Th) ocurre en la madre, cuando reconocen un complejo de MHC-péptido y como resultado proliferan y se diferencian hacia uno de varios perfiles Th: Th1, Th2, Th17 y Treg [67]. Cada una de estas subpoblaciones se especializa en diferentes acciones, como se observa en la figura 2, según el fenotipo de cada una, producirá un diferente patrón de citocinas que a su vez ejercerán distintos efectos en las células blanco, así, por ejemplo, los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) con la liberación de citocinas como TNF- α e IFN- γ , regulan la respuesta inmunitaria contra

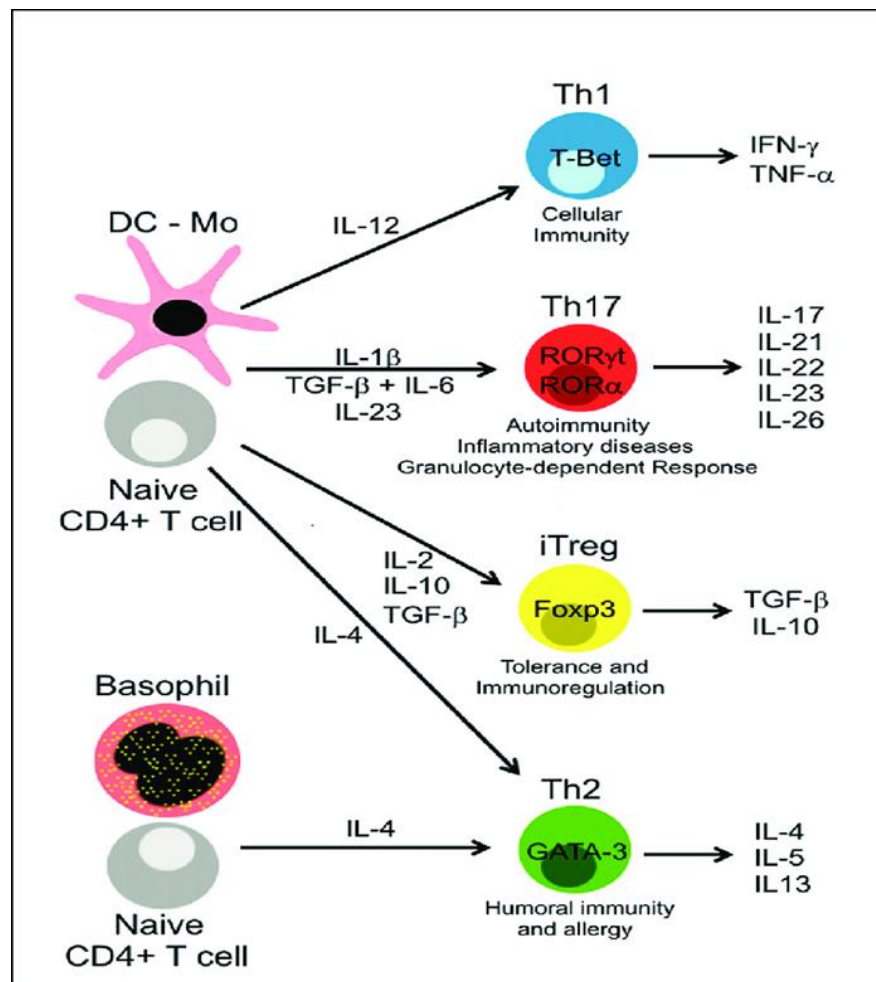


Figura 2. Diferenciación de linfocitos Th *naive* a distintas subpoblaciones: Th1, Th2, Th17 y T reg. Las células presentadoras de antígeno (APC) estimulan a las células T indiferenciadas (*naive*) a desarrollar características de los linajes Th1, Th2, Th17 y Treg. Recientemente, se describió que los basófilos tienen un papel importante en la diferenciación hacia Th2. Perrigoue, J.G. et al. 2009.

agentes patógenos intracelulares, los linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2) con la liberación de citocinas como IL-4, IL-13 e IL-5, regulan la respuesta contra agentes patógenos extracelulares, los linfocitos T cooperadores tipo 17 (Th17) con la liberación de IL-17, IL-21, IL-22, IL-23 e IL-26, desempeñan un papel importante en la inmunidad mediada por células, y colaboran en la defensa contra hongos, y por último, los linfocitos T reguladores (Treg) con la liberación de TGF- β e IL-10 tienen la capacidad de inhibir y controlar la respuesta inmunitaria[68][69].

Dentro de estas subpoblaciones, los linfocitos Treg sobresalen por su peculiar e importante función de regular a otras poblaciones celulares, así como el ambiente bioquímico. Cébulo y colaboradores recientemente describieron la presencia de estas células en calostro humano, reportándolas como linfocitos Treg viables, con fenotipo CD4⁺ CD25⁺⁺ Foxp3⁺[70]. Su presencia en calostro juega un papel importante debido a que el sistema inmune del recién nacido se encuentra inmaduro y poco apto para responder frente a nuevos retos antigénicos y generar tolerancia por sí mismo a los nuevos microorganismos comensales con los que coexistirá en la nueva etapa de su vida. Los linfocitos Treg que se transfieren al neonato mediante el calostro pueden formar parte de los mecanismos de tolerancia y regulación de respuestas inmunes que la madre proporciona al neonato post parto, como contribución a la homeostasis del sistema inmune del recién nacido[70]. De este modo, la alteración en la densidad celular y fenotipo de linfocitos Treg en calostro humano debida a diversos factores pudiera afectar su función y generar algún efecto no deseado en el neonato. Respecto a esto, se ha reportado que es posible que la actividad y fenotipo de linfocitos Treg se vean alterados por cambios en el ambiente bioquímico en el que se encuentran, por ejemplo, en psoriasis, el microambiente inflamatorio extremo observado crea un entorno en el que los linfocitos Treg muestran ineficacia y plasticidad[71], asociada con la pérdida de Foxp3 y que como consecuencia causa la reducción de la supresión *in vitro* por Treg y la regulación positiva de IFN γ [72].

Los mecanismos de regulación de linfocitos Treg en calostro humano aún no han sido descritos. Sin embargo, para comprender la importancia de la función y

actividad de los linfocitos Treg en calostro, a continuación se describen algunas de sus características y mecanismos de inmunorregulación generales, por los cuales pudieran estar ejerciendo su acción en calostro humano.

Los linfocitos Treg se generan de dos maneras; la primera, durante la maduración en el timo a partir de células T autorreactivas, a estos linfocitos se les denomina Treg naturales. La segunda forma es inducirse en el sitio de una respuesta inmunitaria, a los que se denominan linfocitos Treg inducidos. Ambos tipos son identificados por la presencia de los marcadores CD4 y CD25 sobre su superficie, así como por la expresión del factor de transcripción interno FoxP3 [73][69]. Dentro de sus funciones, los linfocitos Treg son cruciales para mitigar respuestas autorreactivas que no se han evitado por medio de otros mecanismos. Por ejemplo, se ha descrito que en modelos de ratones con disminución o ausencia de linfocitos Treg se presentan reacciones inflamatorias autorreactivas. Además, los linfocitos Treg desempeñan un papel importante en la limitación de la respuesta de linfocitos T efectores, tales como linfocitos T, B y NK activados ante la presencia de un agente patógeno[74][75]. Los distintos mecanismos por los cuales los linfocitos Treg median la respuesta inmune, se pueden llevar a cabo vía contacto dependiente y contacto independiente [76]. En la figura 3 se muestra un esquema en el que se representan los mecanismos de regulación de los linfocitos Treg, en esta se observa su interacción con linfocitos T efectores y células presentadoras de antígeno (APC). Estas interacciones pueden ser mediante liberación de moléculas, representado al mecanismo contacto independiente, y por la interacción entre moléculas de superficie, representando al mecanismo contacto dependiente[77]. El mecanismo contacto independiente de los linfocitos Treg consiste en la regulación mediante la liberación de moléculas que ejercen su efecto en distintas células blanco, por ejemplo la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los linfocitos T activados a través de la secreción de citocinas inmunosupresoras como IL-10, TGF- β 1 e IL-35[78], que también impide la presentación de antígenos y modula la supervivencia celular de linfocitos T efectores[79].

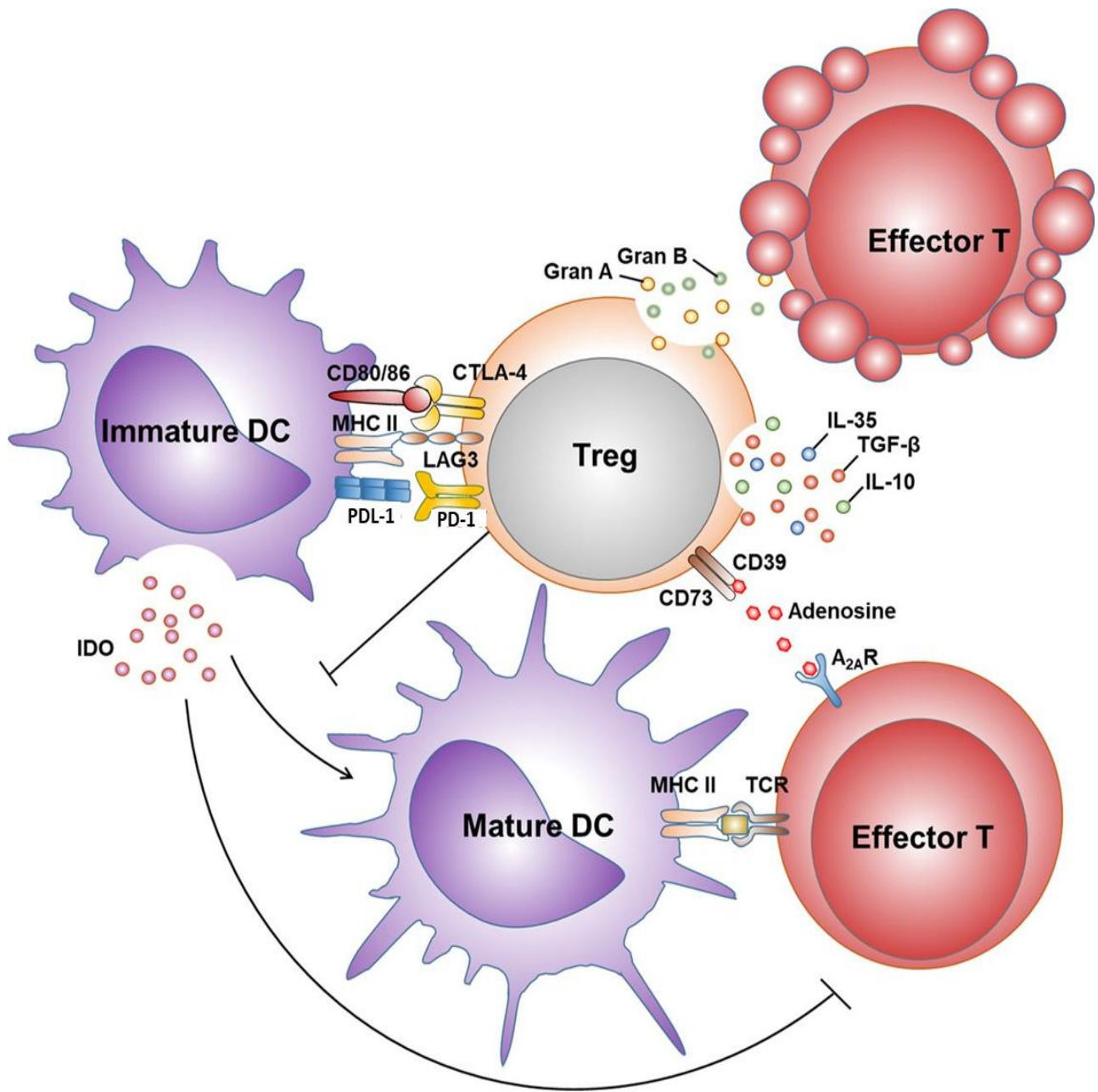


Figura 3. Mecanismos de inmunorregulación de linfocitos Treg. Los linfocitos Treg suprimen la activación de las células T efectoras mediante la modulación directa de la maduración y las funciones de las APC; la mediación de la muerte de las células blanco, incluidas las células T efectoras, la expresión de moléculas inhibitorias tales como CTLA-4, PD-1, y citocinas como TGF- β e IL-10, así como por medio de la secreción de granzimas A y B. Yang, S.H. *Clin Sci*, 2018.

Estas citocinas juegan un papel importante en la actividad de los linfocitos Treg debido a sus características inmunoregulatoras. Por ejemplo, TGF- β es un potente inhibidor de la proliferación de células epiteliales, endoteliales, linfoides y mieloides; regula las funciones celulares de múltiples facetas, incluida la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia[80]. Se considera un inhibidor del crecimiento, ya que hay evidencias que sugieren que TGF- β puede bloquear el ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S, mediante la inducción de un conjunto de genes conocidos como inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (Kip)[80] [81]. Por su parte, la interleucina 10 (IL-10) es importante en la limitación de la respuesta inmune montada por parte del hospedero en presencia de patógenos, previniendo así el daño al huésped por una respuesta inmune aumentada y manteniendo la homeostasis normal del tejido. La actividad inmunosupresora de IL-10 está mediada por el receptor heterodimérico IL-10R1 e IL-10R2, la unión de IL-10 con su receptor activa la vía de señalización JAK / STAT, lo que lleva a cambios en el perfil de expresión de los genes inmunomoduladores que, en efecto, sirven para inhibir la liberación de mediadores proinflamatorios, disminuyen la presentación de antígeno y fagocitosis y al mismo tiempo mejoran la inhibición, tolerancia y funciones de eliminación de estas células [82][83]. Otros mecanismos de regulación de los linfocitos Treg vía contacto independiente son competencia por moléculas necesarias para la supervivencia de otras células, como la privación de IL-2 mediante su receptor IL-2R α (CD25), citocina necesaria para la proliferación y supervivencia de los linfocitos T efectores, y también mediante la liberación de perforinas y granzimas, proteínas que ocasionan la destrucción de linfocitos T efectores[77] [84].

Por otra parte, el mecanismo contacto dependiente consiste en la inhibición por parte de los linfocitos Treg mediante contacto célula-célula. En este caso, como ejemplos podemos mencionar la inhibición mediante la interacción de las moléculas inmunoregulatoras de superficie celular CTLA-4 y PD-1 con sus respectivos ligandos, B7 (CD80/86) y PDL-1 [85][77]. En estos mecanismos, las moléculas de superficie celular son responsables de los efectos supresores de los linfocitos Treg, algunas características de estas moléculas se describen a continuación.

El antígeno 4 asociado al Linfocito T Citotóxico (CTLA-4 o CD152) es una proteína homóloga a CD28 que tiene afinidad de unión mucho mayor para B7 (CD80/86), molécula presente en las células presentadoras de antígeno (APC). A diferencia de CD28, la unión de CTLA-4 con B7 no produce una señal de coestimulación, de modo que la cantidad relativa de unión de CD28-B7 frente a la unión de CTLA-4-B7 determina si una célula T sufrirá activación o anergia[86]. CTLA-4 se considera una pieza clave en el control inmunitario, una de sus funciones es detener las células T potencialmente autorreactivas en la etapa inicial de la activación de células T *naïve*, generalmente en los ganglios linfáticos. La importancia de la molécula CTLA-4 fue puesta de manifiesto por el reporte de ratones deficientes de CTLA-4 en células Treg, que desarrollaron una enfermedad autoinmune, y disminución en la función supresora de las células Treg[87].

Por otro lado, la molécula de muerte programada 1 (PD-1 o CD279), es una molécula de superficie que de igual forma regula la activación de los linfocitos T a través de la unión a sus ligandos: el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y el ligando de muerte programada 2 (PD-L2)[88, 89]. Similar a la señalización de CTLA-4, la unión de PD-1 con sus ligandos PD-L1 o PD-L2 transduce una señal que inhibe la proliferación y supervivencia de células T, y disminuye la función citolítica y la producción de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2. La vía PD-1 regula a las células T efectoras previamente activadas en las últimas etapas de una respuesta inmunitaria, principalmente en tejidos periféricos[90][91].

Factores que alteran la composición del calostro

Algunos de los diversos factores que alteran la composición del calostro humano son la etapa de lactancia, la paridad, la edad gestacional, la dieta materna, la duración del embarazo, la hora del día de la alimentación, el sexo del neonato, así como el estado de salud tanto de la madre como del recién nacido[92][93]. Algunas de estas variaciones son fisiológicas y se adaptan a las necesidades del neonato, como el cambio de concentración a lo largo del periodo de lactancia. Sin embargo, otros factores se deben a condiciones anormales o patológicas de la madre, como la presencia de diabetes, dieta desequilibrada, desnutrición y obesidad, entre otros, que pueden afectar el valor nutricional de la leche y causar malnutrición infantil, considerándose ambos polos de la misma, tanto desnutrición como sobrenutrición [93, 94]. Según la OMS, se considera malnutrición al desequilibrio entre el suministro de nutrientes y energía, y la demanda del cuerpo de ellos para garantizar el crecimiento, el mantenimiento y las funciones específicas[95].

Desafortunadamente el problema de malnutrición aumenta aceleradamente en la población mundial. Son varios los factores causales involucrados en el problema, desde condiciones sociales, económicas y culturales que llevan a una mala alimentación que se hereda a las generaciones jóvenes creándose un círculo vicioso difícil de romper, en el que incrementa la morbilidad, enfermedades metabólicas, cardiovasculares y la mortalidad, así como disminuye la nutrición adecuada, rendimiento cognitivo y calidad de vida[96, 97]. En el esquema de la figura 4 se presenta la interacción de estos diversos factores que conllevan a la malnutrición y sus consecuencias tanto en salud como socioeconómicas[97-99]. Podemos observar que existen causas como el contexto sociocultural, económico y político, que a su vez se asocia con el acceso deficiente para la madre y el neonato a viviendas, hospitales, espacios e ingresos necesarios para llevar a cabo un desarrollo saludable. Esto se relaciona con alimentación baja en calidad nutritiva para la madre y el recién nacido, servicios de salud inadecuados o inexistentes, falta de orientación sobre lactancia y nutrición, que a su vez favorece la presencia

de enfermedades en la madre y el infante, que por la falta de recursos no se resuelve adecuadamente, y trae consigo malnutrición y enfermedad, que a largo plazo tiene como consecuencia el incremento de la morbilidad y mortalidad materna e infantil, discapacidad, baja habilidad cognitiva, educación reproductiva inadecuada o inexistente, desnutrición, enfermedades metabólicas, sobrepeso y obesidad [100] [101]. Todos estos factores se heredan de generación en generación e impiden la mejora y desarrollo en términos de salud y socioeconómicos de las poblaciones que lo padecen [102, 103].

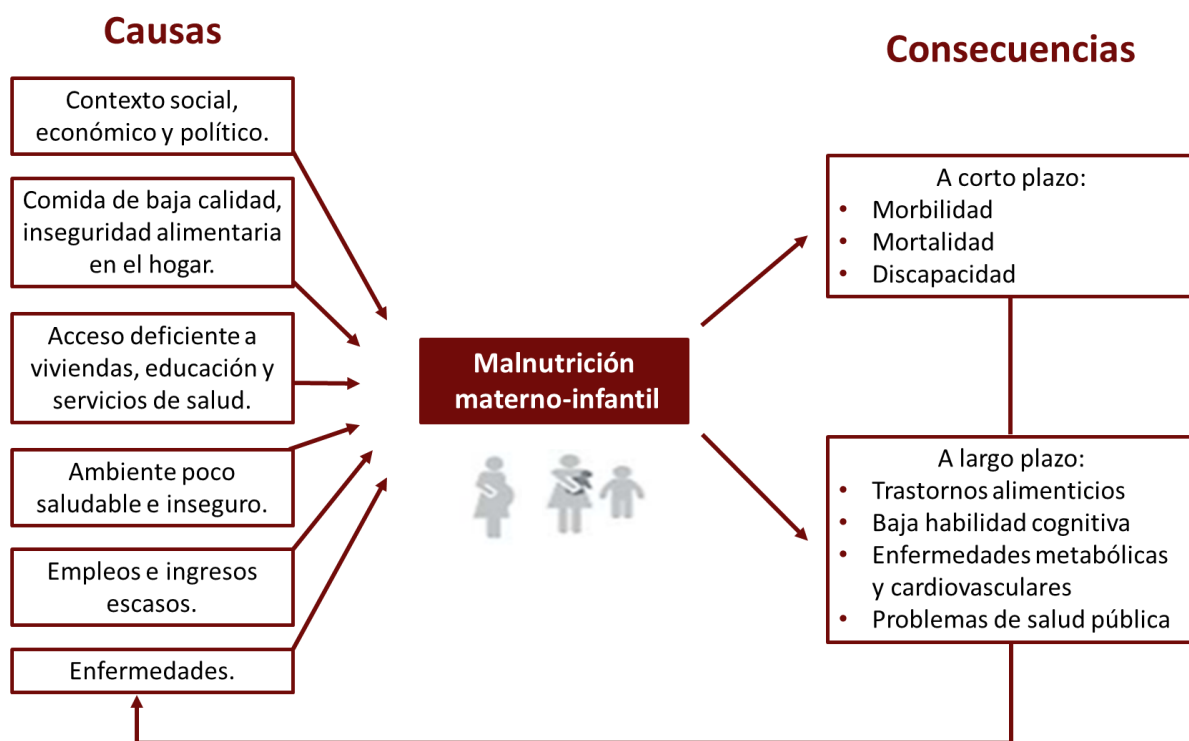


Figura 4. Esquema de causas y consecuencias de malnutrición materno-infantil. Se muestran los factores que favorecen la aparición de malnutrición materno-infantil, así como sus consecuencias.

Obesidad y lactancia

La obesidad se define como un desequilibrio en el que hay una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo que puede ser perjudicial para la salud. Este padecimiento se considera una enfermedad crónica de origen multifactorial que está asociada a complicaciones potencialmente graves, por lo que demanda un enfoque multidisciplinar por su gran repercusión clínica y elevado costo sanitario [104]. Actualmente la obesidad se comporta como una epidemia mundial notoriamente difícil de resolver, por lo que la prevención del padecimiento es fundamental[99]. Particularmente, la obesidad materna es un problema importante de salud pública que se asocia con repercusiones tanto para la madre como para el feto en desarrollo y posteriormente, el lactante[105]. Durante el embarazo y lactancia, este estado metabólico puede afectar la salud materna, el crecimiento neonatal y programar un conjunto de respuestas fisiológicas en el feto que predispone a la descendencia a padecer obesidad y enfermedades metabólicas y cardiovasculares en la vida futura[106] [107] .

Para el diagnóstico de obesidad materna se toma como referencia el IMC de la madre al inicio del embarazo. El IMC es un indicador que se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos sobre el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2), considerándose como peso normal a valores de IMC entre 20 y 25, sobrepeso a valores de IMC igual o superior a 25 y obesidad con valores de IMC igual o superior a 30. Según la OMS, desde 1975, la obesidad se ha casi triplicado en todo el mundo[108], dato que muestra que se ha convertido en un problema importante de salud pública que afecta a personas de todas edades y condiciones socioeconómicas[109].

La obesidad materna es resultado de la conjunción de factores biológicos, genéticos y ambientales. En general, los factores determinantes más estudiados de la obesidad están relacionados con el estilo de vida, especialmente con la alimentación y actividad física[110]. La obesidad materna no es sólo el desequilibrio entre las necesidades energéticas y la alimentación, sino también una alteración nutricional que puede coexistir con deficiencias de micronutrientes y otras

enfermedades en la madre y su descendencia; malos hábitos alimentarios, junto con el sedentarismo y la baja actividad física, dan lugar a un aumento drástico de la obesidad materna e infantil[111]. Estudios sugieren que las complicaciones asociadas a la obesidad pueden incluso presentarse desde periodos previos al nacimiento[112]. La prevalencia de obesidad en mujeres en edad reproductiva se ha incrementado a nivel mundial y afecta la salud de por lo menos dos generaciones; no solo daña la salud de la mujer al incrementar el riesgo de diabetes gestacional y a largo plazo diabetes tipo II, sino también coloca a su descendencia en riesgo incrementado de obesidad infantil[112]. Postparto, la obesidad de la madre influye en el desarrollo del neonato, pues se ha reportado que la leche materna de madres con obesidad presenta una mayor concentración de carbohidratos y lípidos, así como un mayor contenido calórico, que favorece la acumulación de grasa en el lactante y desarrollo de sobrepeso y obesidad. Además, las mujeres obesas son más propensas a desarrollar trastornos del embarazo como preeclampsia y diabetes gestacional[113][114], y los descendientes de madres obesas a menudo experimentan trayectorias de crecimiento alteradas y complicaciones metabólicas en la vida posterior[115]. En general, se considera que la asociación de la obesidad con el nivel socioeconómico, y otros factores como el género, edad y etnicidad es compleja [116][117].

La importante repercusión en la salud del aumento excesivo de peso se debe a que el tejido adiposo es un tejido endocrino complejo y metabólicamente muy activo. Éste ejerce sus funciones autocrinas, endocrinas y paracrinas sobre el resto de órganos a través de la secreción de una gran variedad de adipocinas responsables de la comunicación intercelular, que inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas[118].

El tejido adiposo cumple funciones como el mantenimiento del balance energético, la termorregulación, el metabolismo de lípidos y glucosa, la modulación de la función hormonal y reproductiva, la regulación de la presión arterial y coagulación sanguínea. Además, desempeña un papel fundamental sobre las cascadas inflamatorias, procoagulantes, antifibrinolíticas y vasoactivas, lo que sugiere una influencia directa sobre el proceso inflamatorio[118]. Entre los tipos celulares del tejido adiposo se han descrito adipocitos, células madre, preadipocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células endoteliales. El equilibrio entre estos diferentes tipos celulares, así como su perfil de expresión, están estrechamente relacionados con el mantenimiento de la homeostasis energética y se ha descrito que el incremento del tamaño de los adipocitos, del número y tipo de linfocitos y macrófagos infiltrados está estrechamente relacionado con las enfermedades del síndrome metabólico. Concretamente, en condiciones de obesidad se ha demostrado que en aproximadamente un 70-80% de los individuos se produce un remodelado del tejido adiposo (*adipose tissue remodeling*), tanto a nivel estructural como funcional que provoca una reacción inflamatoria[104]. En la figura 5 se representan algunos de los cambios que sufre el tejido adiposo sano en condiciones de obesidad, que incluyen hipertrofia en adipocitos, desregulación de factores de crecimiento como la disminución de la secreción de eritropoyetina, incremento de adipocinas como la resistina, que favorece la posterior resistencia a la insulina, disminución de linfocitos Treg, incremento de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IFN- γ , cambio de macrófagos con fenotipo M2 a fenotipo M1, entre otros, que en conjunto producen un ambiente proinflamatorio en el tejido adiposo[119]. Cuando la resolución de la inflamación aguda no se resuelve correctamente se desencadena un estado inflamatorio crónico de bajo grado a nivel local con repercusiones sistémicas[120]. De modo que, la obesidad materna es un desbalance de estas señales que conlleva consecuencias importantes como: enfermedades cardiovasculares, principalmente cardiopatías y accidentes cerebrovasculares, diabetes, trastornos del aparato locomotor como osteoartritis, y algunos tipos de cáncer, como de endometrio, mama, ovarios, hígado, vesícula biliar, riñones y colon, entre otros[118][120].

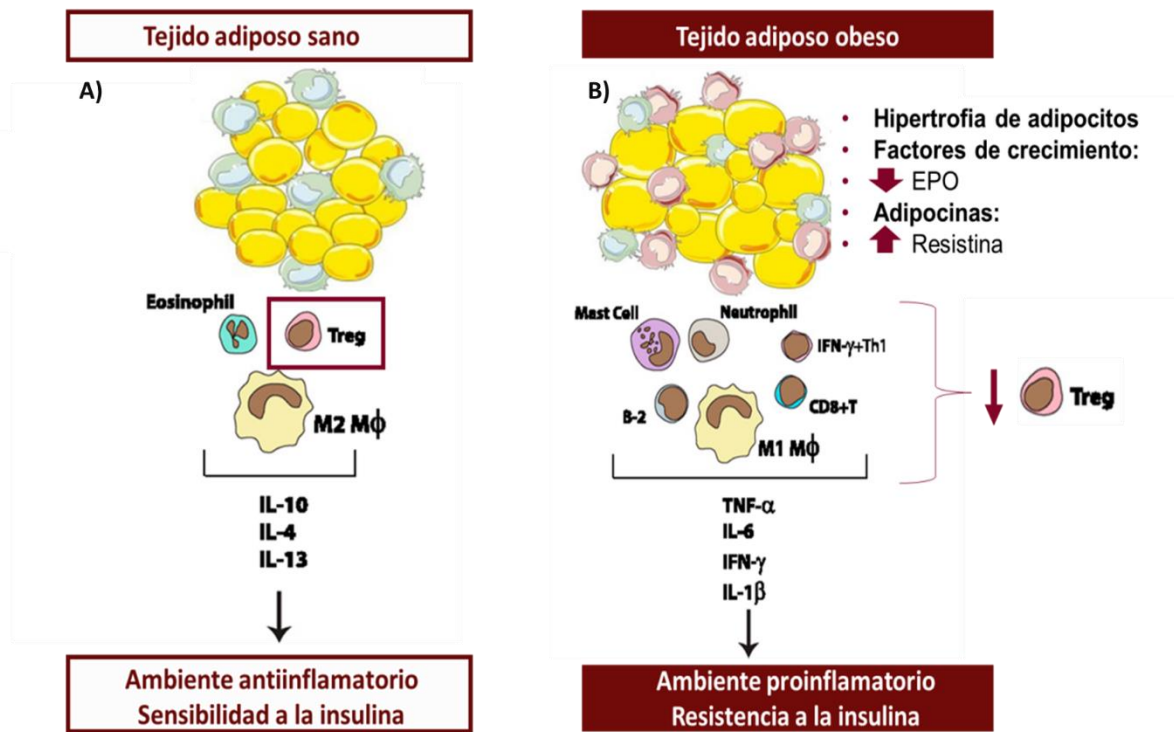


Figura 5. Ambiente proinflamatorio en tejido adiposo en obesidad. A) El tejido adiposo sano presenta un ambiente antiinflamatorio, en el que se encuentra presencia de linfocitos Treg, macrófagos con fenotipo M2 y citocinas como IL-10, IL-4 e IL-13. B) El tejido adiposo obeso sufre cambios como hipertrofia de adipocitos, disminución de factores de crecimiento como la EPO, incremento de adipocinas como resistina, cambio de fenotipo de macrófagos a M1 y presencia de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-1 β , así como la disminución de linfocitos Treg. Modificado de: *Fahumiya Samad et al., 2013*

Las características funcionales y biológicas que presenta un compartimento como el calostro dependen del adecuado equilibrio bioquímico que se genera entre sus componentes celulares y solubles, resultado de la interacción entre ellos. Los linfocitos Treg son parte de un ambiente biológico en el que su función es regular la activación, función y maduración de distintos tipos celulares y además se ven involucrados en la liberación y efecto de sustancias como factores de crecimiento, citocinas, adipocinas, hormonas, enzimas, quimiocinas, entre otras, que actúan en conjunto con el fin de conservar un equilibrio homeostático. Estos componentes son parte de un escenario complejo en el que la modificación de alguno de los elementos en calostro por la influencia de un factor como la obesidad pudiera causar un desbalance que puede traer consigo diferentes consecuencias que pudieran resultar nocivas para el óptimo desarrollo neonatal.

JUSTIFICACIÓN

La obesidad es considerada una enfermedad crónica de origen multifactorial que en la población obstétrica afecta la salud materna y predispone a la descendencia a padecer enfermedades en su vida temprana y futura. Además de la condición intrauterina, la alimentación a través de la lactancia son un punto clave para que el recién nacido se nutra, desarrolle y proteja a lo largo de su vida, siendo la obesidad una condición en la que los componentes de leche materna tienen diferentes características a las de mujeres con peso normal. La composición de la leche cambia conforme avanza el tiempo de la lactación, sin embargo, el calostro es particularmente rico en moléculas bioactivas (como citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y adipocinas) y células inmunorreguladoras (incluyendo los linfocitos Treg), quienes contribuyen a la maduración y establecimiento del sistema inmune del recién nacido. En tejido adiposo, tanto las moléculas bioactivas y las células inmunorreguladoras están relacionadas entre sí, sin embargo, aún se desconoce esta asociación en el calostro humano, motivo por el cual, en este trabajo busca establecer como la obesidad materna influye en la composición de estos componentes inmunes.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Hay relación entre las frecuencias de linfocitos Treg, las concentraciones de citocinas proinflamatorias, adipocinas y factores de crecimiento en calostro humano de mujeres con obesidad?

HIPÓTESIS

El calostro de mujeres con obesidad tendrá una frecuencia menor de linfocitos Treg y mayor concentración de mediadores proinflamatorios.

OBJETIVOS

Objetivo General

Cuantificar linfocitos Treg, citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y adipocinas en calostro humano de mujeres puérperas con diferentes IMC, y establecer la relación que hay entre los parámetros cuantificados y el IMC de la madre.

Objetivos particulares

1. Cuantificar las citocinas: IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-17F, IL-4, IL-21, IL-22 pertenecientes a los perfiles Th1, Th2 y Th17 en muestras de calostro mediante inmunoensayos.
2. Cuantificar los factores de crecimiento: angiopoyetina-2, EGF, EPO, G-CSF, FGF-básico, GM-CSF, HGF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, SCF, TGF- α , VEGF, en muestras de calostro mediante inmunoensayos.
3. Cuantificar las adipocinas: adiponectina, adiposina, leptina y resistina en muestras de calostro mediante inmunoensayos.
4. Cuantificar Linfocitos Treg en muestras de calostro mediante inmunomarcado y análisis multiparamétrico con citometría de flujo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo del estudio realizado fue evaluado y aprobado por el comité de investigación, ética y bioseguridad del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), por el cual fue financiado y cuyo registro es: 3120-20706-01-16.

Diseño de estudio

En el proyecto se realizó un estudio analítico observacional transversal prospectivo.

Población de estudio

Se analizaron muestras de calostro de mujeres puérperas pacientes del INPer. Las pacientes se estratificaron en tres grupos según su IMC: mujeres con peso normal (N: $18 < \text{IMC} < 25$), sobrepeso (SP: $25 < \text{IMC} < 30$) y obesidad (Ob: $\text{IMC} > 30$). Las mujeres participantes firmaron un consentimiento informado para ser parte del protocolo, el cual se encuentra en el Anexo 1.

Para evitar la presencia de factores confusores en los resultados obtenidos, se aplicaron los siguientes criterios de exclusión:

- A. Mujeres con hijos que presentaron alteraciones genéticas o cromosómicas
- B. Mujeres con comorbilidades como enfermedades autoinmunes, diabetes y/o hipertensión.
- C. Mujeres con contraindicación para la lactancia humana.
- D. Mujeres con antecedentes de tabaquismo, drogadicción o cualquier farmacodependencia.

Obtención de muestras

Las muestras de calostro humano obtenidas se colectaron entre el segundo y tercer día de puerperio mediante la técnica de Marmet, mostrada en la figura 6 y que consiste en realizar los siguientes pasos:

1. Realizar movimientos circulares de los dedos en un mismo punto, sin deslizarlos sobre la piel, oprimiendo el pecho hacia las costillas.
2. Frotar, sin presionar, desde la parte superior hacia el pezón.
3. Sacudir los pechos inclinándose hacia delante.
4. Colocar pulgar y dedos índice y medio en forma de "C", unos 3-4cm por detrás del pezón.
5. Empujar los dedos hacia las costillas, sin separarlos.
6. Presionar y adelantar el pulgar y los dedos hacia el pezón, sin deslizar
7. Rotar la posición de los dedos para vaciar todas las partes del pecho. Utilizar ambas manos en cada pecho

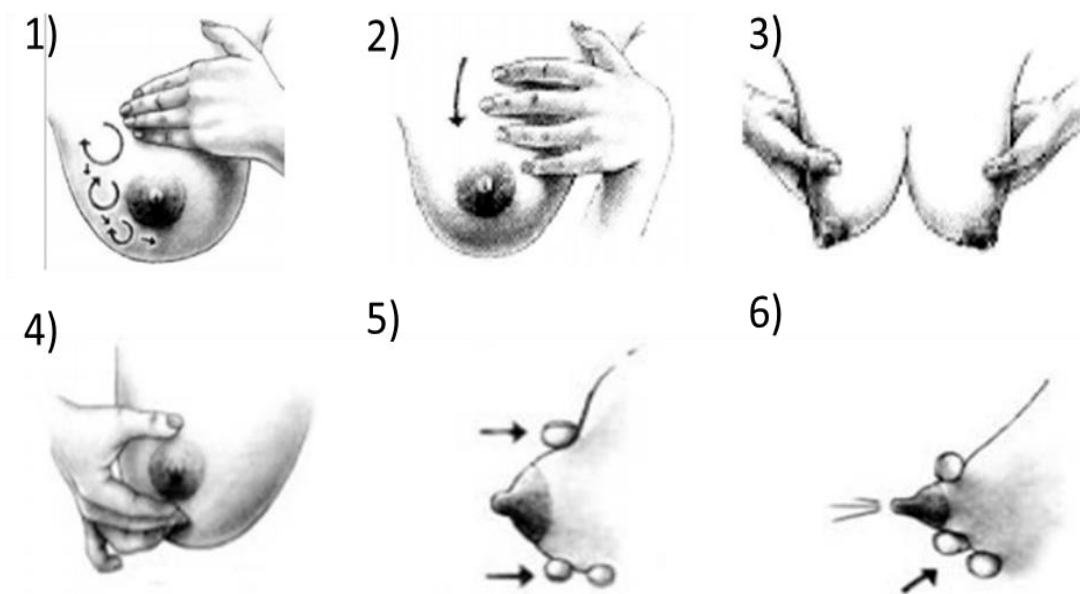


Figura 6. Obtención de calostro humano mediante la técnica de Marmet.
Modificado de: Hospital Clínico San Carlos. www.Madrid.org/hospitalclnicosancarlos.

Tratamiento preanalítico de muestras

Las muestras de calostro se diluyeron 1:4 con solución isotónica amortiguadora (BD, FACSSFlow™ Cat. No. 342003) y se centrifugaron a 600xg durante 15 minutos. Se retiró la grasa de la muestra con una gasa y se separaron el componente soluble y el componente celular. Al componente celular se le realizó un lavado con 500 µL de FACS Flow™. Se determinó la densidad celular y viabilidad mediante una tinción con azul de tripano (1:10), y se contó con el equipo semiautomático Countess® (Invitrogen). Una vez obtenido el conteo, se utilizó el volumen equivalente a 1×10^6 células vivas para cada ensayo. El componente soluble se almacenó a -20°C , para la posterior cuantificación de citocinas, factores de crecimiento y adipocinas.

Inmunomarcaje celular de superficie

Una vez obtenido el volumen equivalente a 1×10^6 células vivas, se incubaron con volúmenes titulados de anticuerpos monoclonales acoplados a distintos fluorocromos, mostrados en la tabla 1. La incubación se realizó por 30 min en obscuridad a 4°C . Posteriormente se adicionó una solución de Paraformaldehído (9.99%) y dietilenglicol (30%) comercial (250µL 1X, BD FACS™ Lysing Solution Cat. No. 349202), se incubó por 10 min en obscuridad a temperatura ambiente para fijar las células de interés. Posteriormente se realizó un lavado para eliminar el anticuerpo excedente con FACSSFlow™ y se analizaron por citometría de flujo.

Tabla 1. Tinción Superficie para identificación y caracterización de linfocitos Treg.

Anticuerpo	Fluorocromo	Clona	Catalogo	Lote	Marca	Volum Titulado (µL)
CD45RO	FITC	SE	555492	41590	BD Biosciences	2.5
CD279	PE	EH12.2	3299906	B201138	BioLegend	2.5
CD3	PerCP	SE	347344	2103919	BD Biosciences	5.0
CD25	PE-Cy7	M-A251	557741	7180556	BD Biosciences	0.3
CD152	APC	L3D10	349908	B185662	BioLegend	2.5
CD4	APC-EF780	OKT4	47-0048-42	E16572-105	eBioscience	0.5
CD45RA	PE-CF594	SE	SE	797594 A	BD Biosciences	0.3
CD45	eF450	HI30	304029	B180440	eBioscience	0.3
FVD	eFluor 506	SE	E15162-127	65-0866-14	eBioscience	0.5

SE: Sin especificar.

Inmunomarcaje intracelular

Para este procedimiento se utilizaron los anticuerpos de superficie mostrados en la tabla 2, los cuales se adicionaron en la muestra y se incubaron por 15 minutos en obscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó una solución permeabilizadora (BD Cytfix/Cytoperm™, Cat 421005), con la que se incubó por 20 minutos a 4°C en obscuridad. En seguida las muestras se lavaron con solución amortiguadora (500µL, 1:10; BD, Perm Wash Buffer™ Cat. No. 421002), y posteriormente se adicionaron los anticuerpos intracelulares α -IL-10 y α -TGF- β (Tabla 2) y se incubaron 30 minutos a 4°C. Se realizó un lavado para eliminar el anticuerpo excedente con FACSFlow™ y se analizaron por citometría de flujo.

Tabla 2. Anticuerpos para tinción de superficie e intracelular.

Anticuerpo superficie	Fluorocromo	Clona	Catalogo	Lote	Marca	Volumen Titulado (µL)
CD45	Pacific Orange	SE	SE	1290788A	Invitrogen	1.0
CD3	PerCP	SE	347344	2103919	BD Biosciences	5.0
CD4	APC-EF780	OKT4	47-0048-42	E16572-105	eBioscience	0.5
CD25	PE-Cy7	M-A251	557741	7180556	BD Biosciences	1.25
CD45RA	PE-CF594	SE	SE	797594 A	BD Biosciences	2.0
CD45RO	FITC	SE	555492	41590	BD Biosciences	2.5
CD127	APC	eBioRDR5	14-1278-42	427253	eBioscience	0.5
Anticuerpos para tinción intracelular						
IL-10	BV21	JES3-9D7	564053	6354639	BD Biosciences	1.5
TGF- β	PE	SE	130-099-947	5141127093	Miltenyi Biotec	2.5

SE: Sin especificar.

Algoritmo de análisis

Para la identificación de linfocitos Treg se utilizó el siguiente algoritmo de análisis: primero se seleccionaron eventos sencillos y se excluyeron eventos agregados en un diagrama de puntos FSC-A vs FSC-H, a partir de los eventos sencillos, con el marcador leucocitario CD45 y el parámetro complejidad (SCC) se seleccionó la población correspondiente a linfocitos totales, y con el marcador de viabilidad

(FVD) se seleccionaron las células vivas. Posteriormente, con la coexpresión de los marcadores CD3 y CD4 se identificó la población de linfocitos T cooperadores o *Thelper* T CD4+ (Th), por último, se seleccionó la población con baja expresión de CD4 y alta expresión de CD25 correspondiente a los linfocitos Treg, en la figura 7 se muestra un esquema representativo del algoritmo antes mencionado.

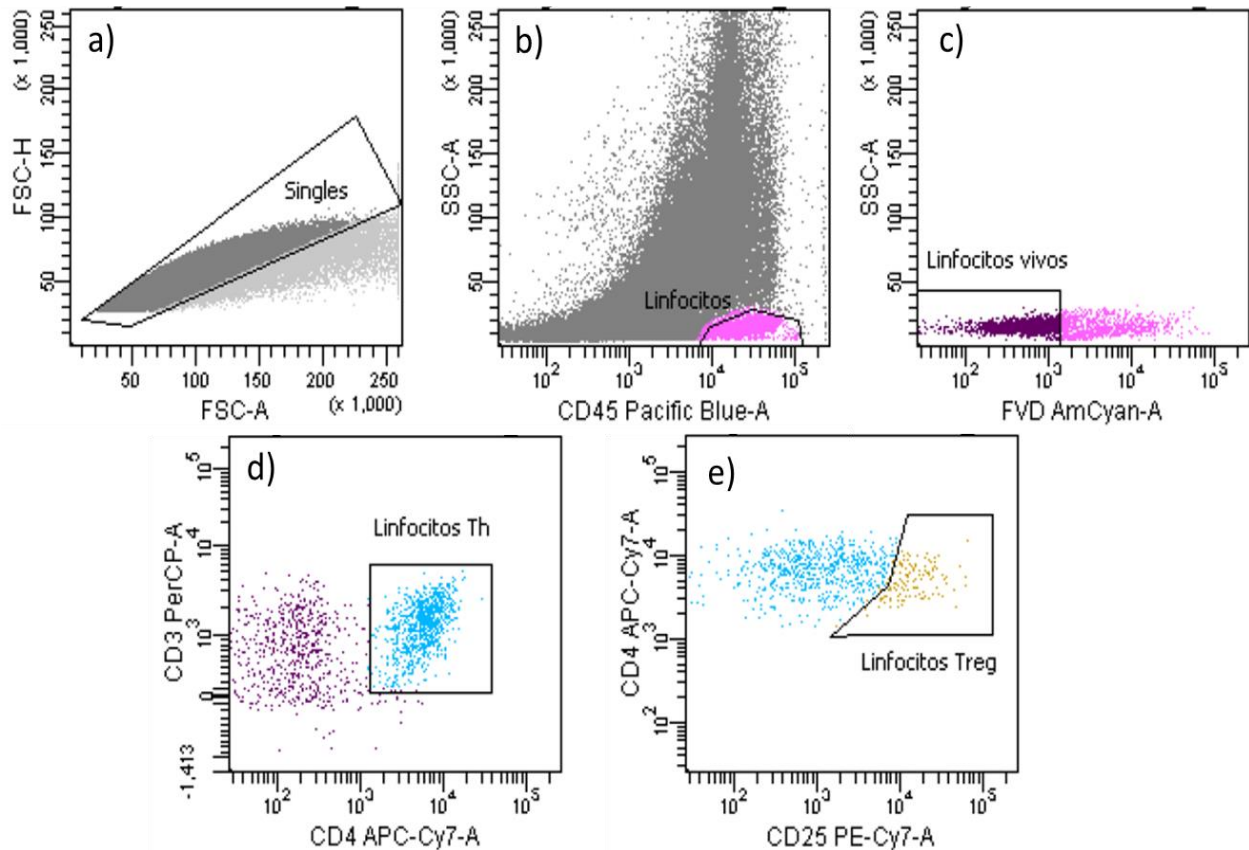


Figura 7. Algoritmo de análisis para la identificación de linfocitos Treg en calostro. a) Se seleccionaron eventos sencillos y se excluyeron eventos agregados en un diagrama de puntos FSC-A vs FSC-H. b) Con el marcador leucocitario CD45 y el parámetro complejidad (SCC) se seleccionó la población correspondiente a linfocitos totales. c) Con el marcador de viabilidad (FVD) se seleccionaron las células vivas. d) Con la coexpresión de los marcadores CD3 y CD4 se identificó la población de linfocitos T cooperadores o *Thelper* (Th). e) Por último con la baja expresión de CD4 y alta expresión de CD25 se identificaron los linfocitos Treg.

Determinación de componentes solubles mediante inmunoensayos

Para la determinación de las concentraciones de los componentes bioactivos solubles en las muestras de calostro humano se utilizaron kits comerciales LEGENDplex™, que constan de perlas de distintos tamaños con anticuerpos acoplados a su superficie, que reconocen a cada uno de los analitos de interés en las muestras; que a su vez se detectan con anticuerpos biotinilados y por último se revelan con la adición de estreptavidina acoplada a ficoeritrina (PE), que se une a la biotina y por medio de PE se obtiene una señal por medio de citometría de flujo. Para obtener la concentración, junto con las muestras se procesó una curva patrón para cada analito.

A continuación, se describen las características de cada uno de los kits utilizados:

Tabla 3. Características del Kit para determinar concentraciones de citocinas, adipocinas y factores de crecimiento.

Analito	Citocinas	Factores de Crecimiento	Adipocinas
Nombre comercial	LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay kit Human Th Cytokine Panel	LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay kit Human Growth Factor Panel	LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay kit Human Metabolic Panel 1
Cat. No.	740001	740180	740212
Marca	BioLegend	BioLegend	BioLegend
Analitos	IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-17F, IL-4, IL-21, IL-22.	Angiopoietin-2, EGF, EPO, FGF-basic, G-CSF, GM-CSF, HGF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, SCF, TGF- α , VEGF	Adiponectina, Adipsina, Leptina, Resistina

Además, se utilizó el software LEGENDplex™ Data Analysis, proporcionado por la casa comercial Biolegend, para realizar la interpolación de los datos obtenidos en la cuantificación de los componentes solubles y obtener las concentraciones correspondientes.

Análisis estadístico

El tratamiento estadístico se realizó con el software GraphPad Prism versión 7.00. Se utilizaron pruebas ANOVA de una vía para la comparación de los tres grupos establecidos y pruebas de correlación de Pearson para determinar asociaciones entre los parámetros evaluados.

RESULTADOS

Características demográficas de la población

Se analizaron un total de 36 muestras de calostro humano. De las cuales, 36 se utilizaron para determinar componentes solubles y 12 para componentes celulares, debido a que las demás no cumplieron con el volumen mínimo de muestra necesario. El valor de n para cada ensayo se muestra en el material suplementario A. La edad de las mujeres donadoras fue en promedio 26.72 ± 8.41 (años), el número de gestas oscila entre 2.05 ± 1.19 , el tiempo de gestación 37.45 ± 1.49 (SDG) y el tiempo de puerperio es de 2.14 ± 0.78 (Días). Del total de nacimientos 18 fueron vía cesárea y 18 vía vaginal. En cuanto a los neonatos, 18 fueron sexo masculino y 18 sexo femenino. Los recién nacidos se encontraron dentro de los parámetros de Apgar recomendados (8.5 ± 1.6), 23 llegaron a término y 13 fueron pretérmino y los promedios de peso y talla de los neonatos fueron 1.20 ± 0.61 (Kg) y 48.15 ± 2.48 (cm) respectivamente.

En la comparación de los parámetros clínicos de las mujeres participantes entre los grupos establecidos que se muestra en la Tabla 4, observamos que la edad de mujeres con peso normal y sobrepeso es menor con respecto a la edad de mujeres con obesidad, lo que sugiere que conforme incrementa la edad de las pacientes, se suelen presentar más casos de obesidad. Para los demás parámetros clínicos evaluados: número de gestas, tiempo de gestación y tiempo de puerperio, se encontró que son similares en los tres grupos de estudio y por tanto no se ven afectados por la condición de la madre.

Tabla 4. Descripción del universo de estudio.

Parámetro	N (n=9)	SP (n=17)	Ob (n=10)	P
Edad	24.22 ± 7.4	26 ± 7.50	33.22 ± 7.30	B, C *
No. Gestas	1.70 ± 1.1	2.5 ± 1.30	1.7 ± 0.97	n.s.
Tiempo Gestación	37.35 ± 1.9	37.36 ± 1.30	37.68 ± 1.60	n.s.
Tiempo de puerperio	2.85 ± 0.8	2.53 ± 1.2	2.44 ± 1.20	n.s.

N vs SP: A N vs Ob: B SP vs Ob: C n.s.: no significativo *P < 0.05
ANOVA de una vía. Prueba Post hoc: Tukey.

La concentración de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias es similar en calostro de mujeres con peso normal, sobrepeso y obesidad.

Como parte del análisis del componente soluble de las muestras de calostro, se comparó la concentración de las citocinas perteneciente a los perfiles Th1, Th2 y Th17, se observó que son similares en las tres condiciones, cuyos resultados se observan en la Tabla 5.

Tabla 5. Comparación de las concentraciones de citocinas evaluadas en los tres grupos de estudio.

Parámetro (pg/mL)	N	SP	Ob	P
IL-5	4.5 ± 4.4	6.4 ± 5.1	10.6± 16.4	n.s.
IL-13	11.3 ± 13.7	12.9 ± 12.8	15.8 ± 20.5	n.s.
IL-2	5.1 ± 9.9	22.4±48.8	1.5± 0.2	n.s.
IL-9	156.4 ± 178.2	86.8 ± 233.9	35.4 ± 64.2	n.s.
IFN-a	9.87 ± 16.3	18.1 ± 41.0	47.3 ± 103.1	n.s.
IL-17a	156.2 ± 291.7	158.80± 270.6	11.9 ± 23.9	n.s.
IL-4	6.8 ± 10.1	21.5±65.0	0.07±0	n.s.
IL-21	99.5± 185.8	70.6 ± 53.3	38.3± 14.2	n.s.
IL-22	74.4± 85.6	144.6± 216.9	52.7± 24.1	n.s.
IL-10	5.1±5.8	12.7±18.7	4.4±6.1	n.s.
IL-17F	46.2±56.8	16.9±19.8	13.2±11.1	n.s.
TNF-a	9.9±16.4	18.1±41.0	47.3±103.0	n.s.
IL-6	214.4±208.3	193.6±211.1	306.1±297.1	n.s.

N vs SP: A N vs Ob: B SP vs Ob: C n.s.: no significativo *P < 0.05
Prueba ANOVA de una vía.

Posteriormente, se realizaron las pruebas de correlación entre la concentración de las citocinas evaluadas y el IMC, resultados que se muestran en la tabla 6, en los que no se encontró alguna asociación.

Tabla 6. Pruebas de correlación entre la concentración de citocinas proinflamatorias y el IMC.

Parámetro	IMC		Parámetro	IMC	
	P	r		P	r
IL-5	n.s.	0.330	IL-17F	n.s.	-0.229
IL-13	n.s.	0.213	IL-4	n.s.	-0.027
IL-2	n.s.	-0.030	IL-21	n.s.	-0.209
IL-9	n.s.	-0.084	IL-22	n.s.	-0.028
IFN-g	n.s.	-0.380	IL-10	n.s.	-0.014
IL-17A	n.s.	-0.258	TNF-a	n.s.	0.061
IL-6	n.s.	0.077			

n.s.: no significativo. Prueba de correlación de Pearson.

Por último, se realizaron las pruebas de correlación entre las concentraciones de citocinas evaluadas y la densidad de linfocitos Treg, para descartar que se encuentren asociadas a los mecanismos de regulación de los linfocitos Treg. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos, en dónde se encontró que la citocina IL-13 se asocia positivamente a la densidad celular de Treg.

Tabla 7. Pruebas de correlación entre la concentración de citocinas proinflamatorias y la densidad celular de Treg.

Parámetro	Linfocitos Treg		Parámetro	Linfocitos Treg	
	P	r		P	r
IL-5	n.s.	-0.304	IL-17F	n.s.	0.628
IL-13	*	0.706	IL-4	n.s.	0.033
IL-2	n.s.	-0.135	IL-21	n.s.	-0.292
IL-9	n.s.	-0.051	IL-22	n.s.	-0.055
IFN-g	n.s.	0.113	IL-10	n.s.	-0.257
IL-17a	n.s.	-0.053	TNF a	n.s.	-0.398
IL-6	n.s.	0.286			

n.s.: no significativo * P<0.05. Prueba de correlación de Pearson.

La concentración de los factores de crecimiento EGF, EPO y FGF-basic se asocian negativamente con el IMC materno

Se realizó la comparación de la concentración de los factores de crecimiento evaluados en cada uno de los grupos evaluados. En los resultados obtenidos, que se muestran en la tabla 8 encontramos que las concentraciones de los factores de crecimiento EGF, EPO y FGF-basic son menores en el grupo de mujeres con obesidad con respecto al grupo de mujeres con peso normal.

Tabla 8. Comparación de concentraciones de factores de crecimiento en los tres grupos de estudio evaluados.

Parámetro (pg/mL)	N	SP	Ob	P
Angiopietin-2 (x10 ³)	13.8±26.6	8.3± 19.6	31.9±30.8	n.s
EGF (x10 ⁴)	2.5±2.0	1.9±2.4	0.5± 0.9	B*
EPO (x10 ²)	3.5±1.6	2.4±1.8	1.5±1.5	B*
FGF-basic (x10 ²)	5.8±2.5	3.4±3.0	2.0± 2.1	B*
G-CSF (x10 ²)	1.1±0.9	10±2.12	0.35±27	n.s
GM-CSF	31.9±42.0	20.5±18.4	11.4±4.9	n.s
HGF (x10 ²)	9.1±10	11.3±10.3	25.7±27.5	n.s
M-CSF (x10 ⁴)	1.4±1.7	0.7±0.0.9	1.5±2.4	n.s
PDGF-AA (x10 ³)	2.4±2.8	1.1±0.8	1.3±1.0	n.s
PDGF-BB (x10 ²)	2.5±1.4	3.5±1.8	2.3±2.3	n.s
SCF (x10 ²)	2.1±1.9	1.0±1.1	0.5±0.7	n.s
TGF-α (x10 ²)	11.2±6.8	5.9±3.2	11.4±7.0	n.s
VEGF (x10 ³)	1.1±0.6	0.5±0.3	1.1±0.7	n.s

N vs SP: A N vs Ob: B SP vs Ob: C
n.s: no significativo *P < 0.05
Prueba ANOVA de una vía.

Posteriormente, se realizaron las pruebas de correlación entre la concentración de factores de crecimiento y el IMC, y se encontró una asociación negativa entre el IMC y las concentraciones de EGF, EPO y FGF-basic, los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Pruebas de correlación entre la concentración de factores de crecimiento y el IMC.

Parámetro	IMC		Parámetro	IMC	
	P	r		P	r
Angiopoietin-2	n.s.	0.156	M-CSF	n.s.	0.131
EGF	*	-0.371	PDGF-AA	n.s.	-0.245
EPO	*	-0.397	PDGF-BB	n.s.	0.027
FGF-basic	*	-0.391	SCF	n.s.	-0.110
G-CSF	n.s.	-0.087	TGF- α	n.s.	0.141
GM-CSF	n.s.	-0.288	VEGF	n.s.	0.266
HGF	n.s.	0.192			

n.s: no significativo *P < 0.05 Prueba de correlación de Pearson.

Por último, se realizó la prueba de correlación entre los factores de crecimiento evaluados y la densidad celular de Treg, y se encontró que el factor GM-CSF se asocia positivamente a la densidad celular de Treg. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Pruebas de correlación entre la concentración de factores de crecimiento y la densidad celular de Treg.

Parámetro	Linfocitos Treg		Parámetro	Linfocitos Treg	
	P	r		P	r
Angiopoietin-2	n.s.	-0.256	M-CSF	n.s.	0.601
EGF	n.s.	0.531	PDGF-AA	n.s.	0.363
EPO	n.s.	0.484	PDGF-BB	n.s.	0.442
FGF-basic	n.s.	0.437	SCF	n.s.	-0.051
G-CSF	n.s.	-0.195	TGF-α	n.s.	0.392
GM-CSF	*	0.691	VEGF	n.s.	0.468
HGF	n.s.	0.609			

n.s: no significativo *P < 0.05 Prueba de correlación de Pearson.

La concentración de resistina en calostro se asocia positivamente al IMC materno

Como parte del componente soluble también se evaluó la concentración de las adipocinas adiponectina, adiposina, leptina y resistina. En los resultados observamos que la concentración de resistina es mayor en la condición con obesidad con respecto a los grupos de peso normal y sobrepeso, cuya gráfica se observa en la figura 8. Para adiponectina, adiposina y leptina, se observó que sus concentraciones son similares en los tres grupos de estudio, resultados mostrados en la tabla 11.

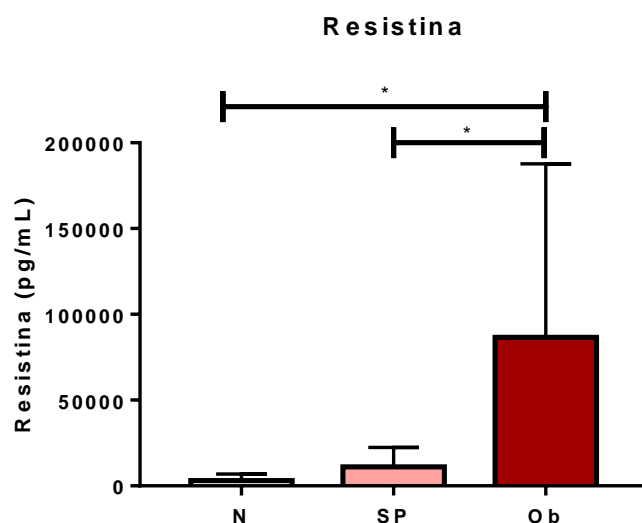


Figura 8. Concentración de resistina en calostro de grupo con obesidad es mayor que grupo peso normal y sobrepeso. Prueba ANOVA de una vía. Prueba Post hoc Tukey.

Tabla 11. Adiponectina, adiposina y leptina evaluadas en los tres grupos de estudio.

Adipocina	N	SP	Ob	P
Adiponectina (x104)	3.6 ± 1.7	4.8 ± 5.2	8.3 ± 6.6	n.s.
Adiposina (x104)	4.8 ± 1.8	9.6 ± 13.4	15.6 ± 12.4	n.s.
Leptina (x103)	3.4 ± 3.8	11.7 ± 21.9	5.4 ± 5.3	n.s.

N vs SP: A N vs Ob: B SP vs Ob: C n.s.: no significativo
Prueba ANOVA de una vía.

Se realizaron pruebas de correlación correspondientes entre la expresión de las adipocinas evaluadas y el IMC, cuyos resultados se observan en la tabla 12, en los que se observa que la concentración adiponectina y resistina están asociadas al IMC de la madre.

Tabla 12. Pruebas de correlación entre la concentración de adipocinas y el IMC.

Parámetro (pg/mL)	IMC	
	P	r
Adiponectina	*	0.437
Adipsina	n.s.	0.300
Leptina	n.s.	0.185
Resistina	**	0.601

n.s: no significativo *P < 0.05 **P < 0.01
Prueba de correlación de Pearson.

Se realizó también la prueba de correlación entre la concentración de las adipocinas evaluadas y la densidad celular de linfocitos Treg, los resultados se muestran en la tabla 13, en la que observamos que no hay asociación entre la concentración de las adipocinas evaluadas y densidad de linfocitos Treg.

Tabla 13. Pruebas de correlación entre la concentración de adipocinas y la densidad de Treg.

Parámetro (pg/mL)	Linfocitos Treg	
	P	r
Adiponectina	n.s.	-0.176
Adipsina	n.s.	0.252
Leptina	n.s.	-0.249
Resistina	n.s.	0.443

n=12

n.s: no significativo

Prueba de correlación de Pearson.

Los porcentajes de poblaciones linfocitarias son similares en el calostro de mujeres de peso normal, sobrepeso y obesidad

Se realizó la comparación de los porcentajes celulares de linfocitos Totales, Th y Treg presentes en las muestras de calostro humano y se encontró que son similares en los tres grupos evaluados (Figura 9).

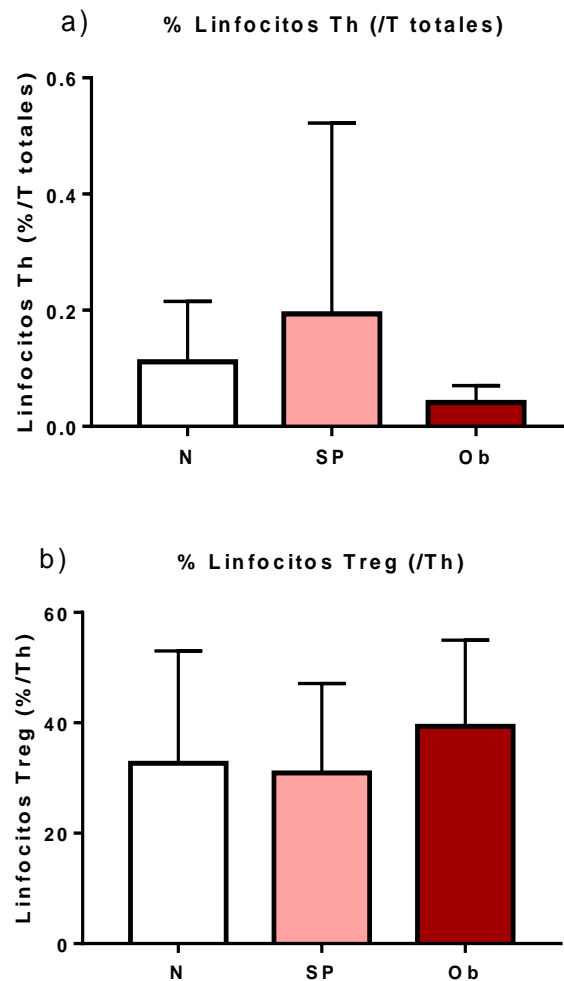


Figura 9. Porcentajes de poblaciones linfocitarias similares en las tres condiciones evaluadas. A) %Linfocitos Th dentro de linfocitos T totales. B) %Linfocitos Treg dentro de Linfocitos Th. Prueba ANOVA de una vía. N (n=5), SP (n=5), Ob (n=2).

La expresión de las moléculas PD-1, CLA-4, TGF-b e IL-10 de linfocitos Treg es similar en el calostro de mujeres de peso normal, sobrepeso y obesidad

Se evaluó la expresión de moléculas de superficie asociadas a la actividad inmunorreguladora, como PD-1 (CD279) y CTLA-4 (CD152), para conocer si la actividad reguladora vía contacto dependiente de los linfocitos Treg se encuentra asociada a la condición de la madre. Se encontró que la expresión de estas moléculas es similar en los tres grupos. Los resultados se muestran en la figura 10.

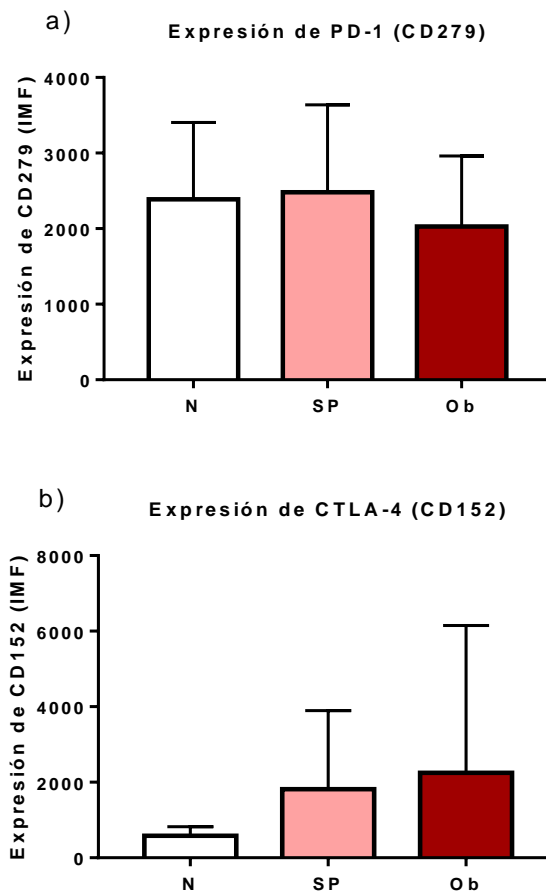


Figura 10. Expresión de moléculas de superficie asociadas a inmunorregulación en las tres condiciones evaluadas. a) Expresión de CD279 o PD-1 (IMF). b) Expresión de CD152 o CTLA-4 (IMF). Prueba ANOVA de una vía. N (n=5), SP (n=5), Ob (n=2).

Se evaluó también la expresión de moléculas de secreción de los linfocitos Treg relacionadas con la actividad inmunorreguladora vía citocinas, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), y la interleucina 10 (IL-10). Se encontró que la expresión de estas moléculas es similar en los tres grupos evaluados, los resultados se observan en la figura 11.

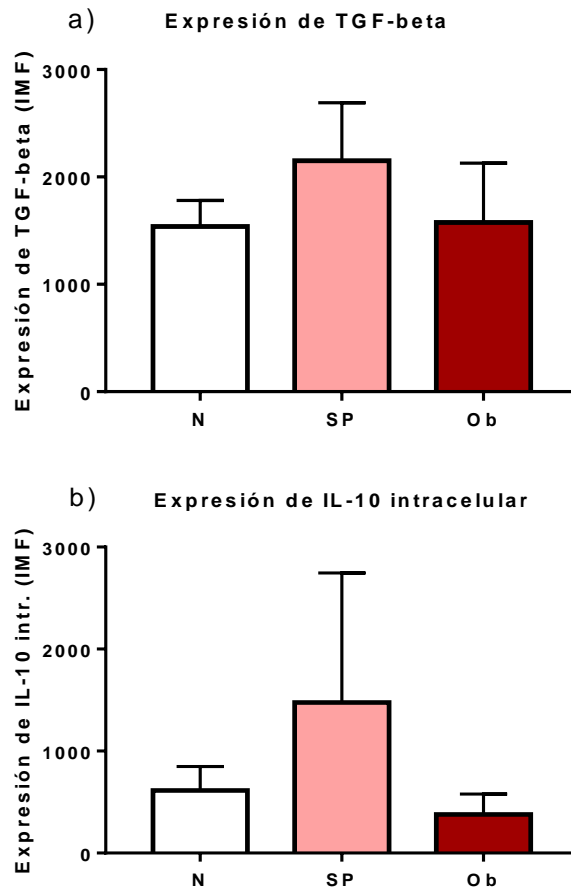


Figura 11. Expresión de moléculas de secreción asociadas a inmunorregulación en linfocitos Treg. a) Expresión de TGF- β (IMF). b) Expresión de IL-10 (IMF). Prueba ANOVA de una vía. N (n=5), SP (n=5), Ob (n=2).

El IMC materno se asocia negativamente a la densidad de linfocitos Treg

Como parte del análisis del componente celular de las muestras de calostro humano obtenidas se realizaron conteos celulares y se identificaron las poblaciones de Linfocitos Totales, linfocitos Th y linfocitos Treg. Se determinó la densidad en cada una de las muestras y se compararon los tres grupos de estudio establecidos: mujeres con peso normal (N), sobrepeso (SP) y obesidad (Ob). En las gráficas de los resultados obtenidos mostrados en la figura 12, a pesar de no haber diferencias entre los grupos, observamos una tendencia a la disminución de la densidad de linfocitos Totales, Th y Treg en la condición con mujeres con obesidad con respecto a mujeres con peso normal.

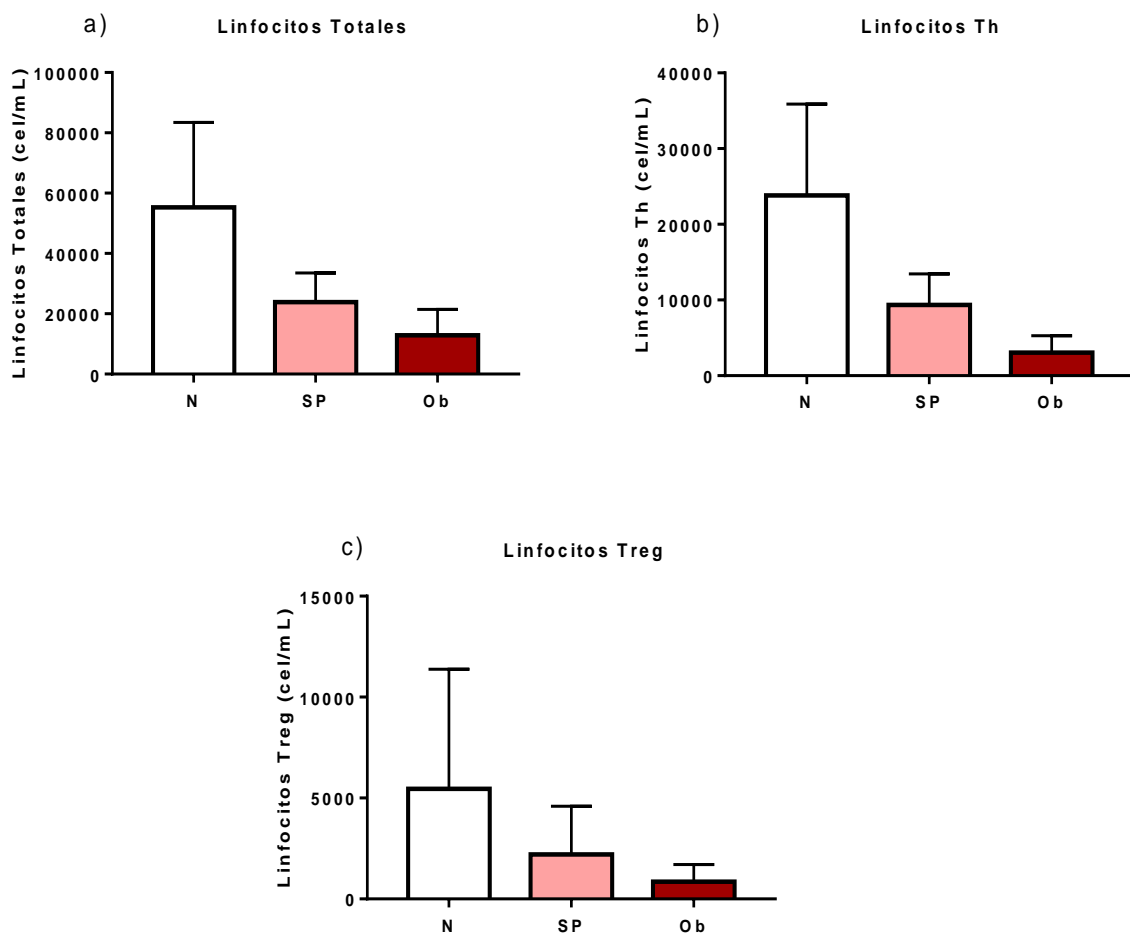


Figura 12. Tendencia a la disminución en la densidad celular de poblaciones linfocitarias en condición de obesidad. Con barras blancas: peso normal (N), en rosa: sobrepeso (SP) y en vino: obesidad (Ob). Prueba ANOVA de una vía. N (n=5), SP (n=5), Ob (n=2).

Posteriormente se realizaron pruebas de correlación entre la densidad de linfocitos Totales, Th y Treg y el IMC materno. Como resultado se encontró una asociación negativa entre el IMC y la densidad de linfocitos Treg (Figura 13).

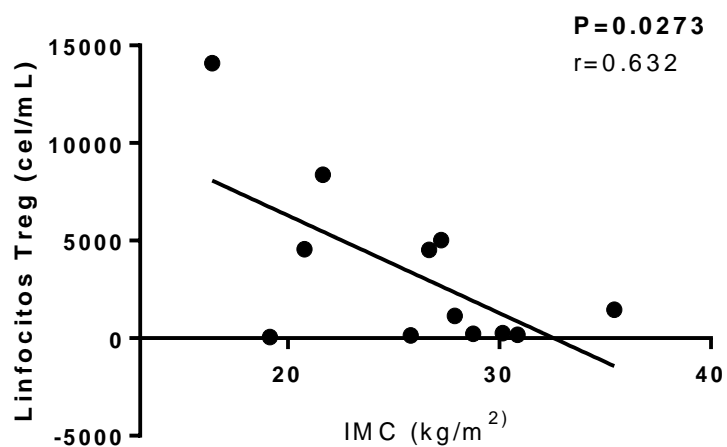


Figura 13. Asociación negativa entre la densidad de linfocitos Treg y el IMC materno. Correlación de Pearson. (n=12)

DISCUSIÓN

Como se ha mencionado, el calostro contiene componentes nutricionales, celulares y moléculas bioactivas, cuya función es contribuir al desarrollo del neonato. La cantidad en la que la madre provee de estos compuestos por medio del calostro es la ideal y necesaria para el recién nacido, de modo que, si hay alteraciones en las concentraciones de estos componentes por condiciones particulares de la madre, podrían tener un impacto en el neonato que finalmente es quién recibe el calostro. Nuestro objetivo en este proyecto fue averiguar si existe asociación entre el IMC y la condición de sobrepeso y obesidad de la madre en la densidad de linfocitos Treg, concentraciones de citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y adipocinas en el calostro humano.

En este trabajo, reportamos que las mujeres con obesidad tienen mayor edad con respecto a las mujeres con sobrepeso y peso normal, lo que indica que en la población existe una tendencia a padecer obesidad conforme avanza la edad de las mujeres, además de esto, se ha descrito que la prevalencia de obesidad en las mujeres es mayor que en los hombres, debido a factores hormonales, ambientales y sociales[121]. Tomando en cuenta ambos aspectos, resulta importante que la medicina preventiva se enfoque en el grupo de población que se encuentra en mayor riesgo, no únicamente por los problemas asociados al embarazo, sino también por todas las complicaciones que la obesidad provoca. Por ejemplo, en las mujeres que padecen obesidad, está incrementado el riesgo de carcinoma de endometrio, mama, ovario, cérvix, vesícula y vías biliares[122], diabetes mellitus tipo II e hipertensión, además de consecuencias psicológicas, sociales y económicas[123]. Para corroborar que esta diferencia en edad entre los grupos evaluados no interfiere en los demás resultados obtenidos, realizamos las pruebas de correlación entre la edad y cada uno de los parámetros evaluados en este proyecto, cuyos resultados se muestran en el material suplementario B, en los que se observa que no hay ninguna asociación, lo que indica que la edad no interfiere en nuestros demás resultados.

Con respecto al componente soluble, las concentraciones de las citocinas de los perfiles Th1, Th2 y Th17 que se evaluaron, resultaron ser similares en los tres grupos de estudio. Esto significa que no hay alguna diferencia en la composición de citocinas y que el sobrepeso y obesidad no influyen en la concentración de éstas en calostro, además de que la densidad celular de Treg tampoco se asociada a citocinas.

Sin embargo, encontramos una asociación positiva entre la densidad de linfocitos Treg y la citocina IL-13. Por su parte, la IL-13 es una citocina producida por linfocitos Th2, es análoga a IL-4 y entre sus funciones se encuentra la inmunorregulación de macrófagos e inhibir linfocitos Th1 y la producción de citocinas proinflamatorias, así que por sus actividades de regulación atribuimos su asociación a la densidad de linfocitos Treg[124].

Encontramos también que los factores de crecimiento EGF, FGF-basic y EPO están disminuidos en la condición con obesidad y se correlacionan de manera negativa con el IMC. El factor de crecimiento epidérmico o EGF, es una proteína que tiene capacidades mitogénicas sobre células epiteliales, hepatocitos, fibroblastos, entre otras, y ha demostrado inducir el crecimiento celular, la diferenciación y la proliferación, además de que tiene un papel importante en el desarrollo del tracto gastrointestinal del neonato[125].

La eritropoyetina o EPO, una hormona glicoproteica derivada del riñón, indispensable para la eritropoyesis, función por la que recibe su nombre. Además de ésta, tiene actividades biológicas que se extienden a otro tipo de tejidos no eritroides. Por ejemplo, tiene efectos antiapoptóticos y antiinflamatorios, mejora la resistencia a la insulina, el metabolismo de la glucosa y contribuye a la disminución de tejido adiposo blanco y regulación del peso corporal[126]. En un estudio realizado por Alnaeeli y colaboradores, utilizando ensayos *in vivo* e *in vitro* en ratones, el tratamiento con EPO inhibió la inflamación causada por exceso de tejido adiposo blanco, normalizó la sensibilidad a la insulina y redujo la intolerancia a la glucosa[127]. Algunos de los mecanismos que se han propuesto es la inhibición de

la infiltración de macrófagos y por inhibición de la inflamación por inhibición de vías asociadas a NF-κB[128][129].

El factor de crecimiento fibroblástico básico o FGF-basic, es una proteína cuya expresión disminuye durante la diferenciación de los adipocitos, y del cual se ha reportado que correlaciona negativamente con el IMC y, junto con EGF, participa en la supresión de la actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), un marcador de diferenciación adiposa, y su disminución implica el favorecer el crecimiento de tejido adiposo[130].

Se encontró también que GM-CSF se asocia positivamente a la densidad celular de Treg, lo cual está relacionado con las características de éste factor de crecimiento, ya que entre sus funciones se encuentra modular la hematopoyesis, controlar la supervivencia, proliferación y diferenciación de linfocitos Treg [131].

Debido a estos mecanismos relacionados con EGF, EPO, y FGF-basic, su concentración disminuida en calostro de madres con obesidad representa un potencial factor de riesgo para el recién nacido, porque recibe una menor concentración de estos factores, lo que puede perjudicar su adecuado desarrollo y crecimiento.

El siguiente hallazgo fue que la concentración de resistina es mayor en la condición de obesidad con respecto a sobrepeso y peso normal y además se asocia positivamente al IMC. El tejido adiposo secreta adipocinas que desempeñan un papel importante en el metabolismo, la inmunidad y la inflamación[132]. La resistina es una adipocina rica en cisteína, secretada principalmente por macrófagos en humanos, los cuales son reclutados a tejido adiposo en obesidad, aumentando los niveles de resistina tanto en tejido adiposo como en circulación[133] [134], además, su expresión está inducida durante la conversión de preadipocitos a adipocitos maduros, por lo que se le supone una función muy importante como regulador de la adipogénesis, razón por la cual se encuentra aumentada en individuos obesos. El incremento de esta adipocina en calostro de mujeres con obesidad resulta como factor de riesgo para el neonato, porque dentro de sus funciones se han reportado que se encuentra relacionada con la patogénesis de la obesidad y resistencia a la

insulina[135]. Esto significa que el aumento de esta adipocina no sólo incrementa en la madre debido a la obesidad, sino que también se transfiere al neonato.

La lactancia es una forma de inmunidad pasiva[136] que, además de proteger de infecciones, ayuda a la tolerancia de antígenos ambientales y es esencial para la homeostasis a corto y largo plazo de los neonatos. Dentro de las células que cumplen estas funciones se encuentran los linfocitos Treg; una subpoblación especializada de linfocitos T que actúan para suprimir la respuesta inmune, manteniendo así la homeostasis y la tolerancia propia[137]. La presencia de esta población celular se reportó recientemente en calostro humano, descritos con fenotipo CD127^{CD25}^{high}Foxp3⁺ y con alta expresión de las moléculas CD152, CD279 y TGF- β , que se asocian a la inmunorregulación[70]. Se ha demostrado que los Treg son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T activados, además de que juegan un papel importante en la producción de citocinas, por lo que la desregulación en la frecuencia o microambiente de los linfocitos Treg, puede conducir al desarrollo de diversas patologías, por ejemplo, enfermedades autoinmunes[138]. Sakaguchi y colaboradores confirmaron que su actividad está regulada por numerosas interacciones coestimuladoras y el microambiente de las citocinas y otras moléculas es de suma importancia, tanto en el timo como en los tejidos, para mantener la autotolerancia y control de la respuesta inmune. Particularmente nos interesa estudiar más a fondo a la población de linfocitos Treg en calostro y su microambiente porque forman parte de los mecanismos que contribuyen al control de la respuesta inmune en los primeros meses de vida, dentro de sus funciones descritas se encuentra que los Treg participan en el mantenimiento de la tolerancia periférica[139], prevención de enfermedades inflamatorias[140], reconocimiento inmunitario de los antígenos de la microbiota intestinal, prevención de enfermedades inflamatorias en intestinos[141][142], prevención de alergias y padecimientos de asma, etc. Los linfocitos Treg muestran el potencial inmunosupresor más potente entre las poblaciones celulares y su presencia es capaz de influenciar importantemente el microambiente inmunológico y bioquímico que el neonato recibe por parte de su madre, motivo por el cual, estudiar el microambiente en calostro resulta necesario[143][144].

Respecto al componente celular evaluado en las muestras de calostro, evaluamos la expresión de moléculas de superficie CTLA-4 y PD-1, y las moléculas intracelulares TGF- β e IL-10. CTLA-4 o CD279 y PD-1 o CD152, son algunos de los receptores de membrana asociados a Treg conocidos, y se ha descrito que tienen una función en la actividad de Treg. Ambos son coestimuladores negativos en la activación de células T [145, 146]. Retomando algunas de sus funciones, PD-1 ha demostrado ser coestimulador negativo de la activación celular porque produce un bloqueo de la entrada de las células en el ciclo celular y la producción de citoquinas efectoras[147]. CTLA-4 también inhibe la activación de las células T al reducir la expresión del receptor de IL-2 y al detener las células en la fase G1 del ciclo celular[148], además de antagonismo competitivo de la vía de coestimulación mediada por CD28/B7[149]. La función principal de la IL-10 es mantener las respuestas inmunes bajo control[150] y la IL-10 regula a la baja la expresión de varias moléculas coestimuladoras, incluidas CD80 y CD86, y el MHC de clase II[151], que afecta la capacidad de las células presentadoras de antígenos (APC) para activar las células T[150, 151]. TGF- β , por su parte, presenta potentes efectos antiproliferativos hacia linfocitos T CD4+, debido a su capacidad para inhibir la producción de IL-2 y propiciar la regulación de inhibidores del ciclo celular[152]. Respecto a estas moléculas, encontramos que su expresión es similar en las tres condiciones y no se asocia con el IMC, lo que sugiere que la actividad inmunorreguladora de los linfocitos Treg es igual en los tres grupos.

Por último, nuestros resultados muestran que existe una tendencia a la disminución en la densidad celular de linfocitos Totales, Th y Treg en el calostro de mujeres con obesidad, y una asociación negativa entre la densidad celular de Treg y el IMC. Esto concuerda con la hipótesis planteada, en la que se espera una disminución de linfocitos Treg, similar a lo que se ha reportado en la literatura para tejido adiposo y circulación sanguínea[153], debido a la condición de inflamación crónica que propicia el desajuste metabólico en la obesidad. Esto implica que el neonato no recibe la cantidad adecuada de linfocitos Treg, lo que puede repercutir en su correcta respuesta inmune, así como en el desarrollo de mecanismos de tolerancia adecuados.

Los resultados obtenidos en este estudio revelan que puede haber consecuencias nocivas para los recién nacidos alimentados con calostro de mujeres obesas, puesto que, aunado a que la leche materna de mujeres obesas contiene una mayor cantidad de carbohidratos, lípidos y calorías, recibe también un microambiente adecuado para desarrollar obesidad. Estudios anteriores han demostrado la presencia de hormonas y factores de crecimiento en la leche materna que pueden influir en la adiposidad infantil. Además, padecer obesidad en la infancia aumenta el riesgo de desarrollar obesidad y sus comorbilidades relacionadas en la edad adulta[154]. Por todo esto, es importante reforzar la prevención, tratamiento y control clínico de la obesidad en mujeres en edad reproductiva, embarazadas y lactantes, haciendo conciencia y enfatizando que los riesgos que puede sufrir el neonato por este padecimiento materno pueden ser evitados.

Finalmente, es importante resaltar que la lactancia va íntimamente ligada al desarrollo, tanto a nivel individual como social, de forma tal que contar con más niñas y niños que a futuro presenten mejores condiciones de salud, permitirá impulsar el crecimiento económico y social de los países, lo que se contribuye a las metas de los objetivos de desarrollo sustentable deseado a nivel mundial.

CONCLUSIÓN

La concentración de componentes bioactivos en calostro humano se ve alterada por la obesidad materna, la cual propicia un microambiente celular y bioquímico descompensado, con una tendencia a la disminución en la densidad de linfocitos Treg y asociación negativa con el IMC, además de una asociación del IMC negativa para los factores de crecimiento EPO, EGF y FGF-basic, y positiva para resistina, cuyas funciones están implicadas en mecanismos que favorecen el desarrollo de obesidad, y pudieran tener efectos indeseables en el neonato que recibe el calostro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oddy, W.H., *Breastfeeding, Childhood Asthma, and Allergic Disease*. Ann Nutr Metab, 2017. 70 Suppl 2: p. 26-36.
2. Lewis DB, Wilson CB. Developmental immunology and role of host defenses in neonatal susceptibility to infection. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 7.ed. Philadelphia: Saunders; 2011. p.83-169.
3. Hanson, L.A., et al., *The transfer of immunity from mother to child*. Ann N Y Acad Sci, 2003. 987: p. 199-206.
4. Ballard, O. and A.L. Morrow, *Human milk composition: nutrients and bioactive factors*. Pediatr Clin North Am, 2013. 60(1): p. 49-74.
5. Glasier A, McNeilly AS, Howie PW. La respuesta de la prolactina al amamantamiento. Endocrinología clínica. 1984; 21 : 109–116
6. Ramsay DT, et al. Imagen de ultrasonido de la eyección de leche en el seno de mujeres lactantes. Pediatría. 2004; 113 : 361–367.
7. McCann J. Breastfeeding, A guide for the medical profesion, Womenshealth, AAP, UNICEF.
9. Uvnas Moberg K. La neuroendocrinología de la interacción madre-hijo. Tendencias en endocrinología y metabolismo. 1996; 7 : 126-131
10. Nutrition During Lactation Institute of Medicine (US) Committee on Nutritional Status During Pregnancy and Lactation. Washington (DC): National Academies Press (US); 1991.
11. García-López R. Composición e inmunología de la leche humana. Acta Pediatr Mex 2011;32(4):223-230.
12. Casey C, et al. Ingesta de nutrientes por lactantes amamantados durante los primeros cinco días después del nacimiento. Revista Americana de Enfermedades de la Infancia. 1986; 140 : 933–936
13. Lawrence RA, Lawrence RM. La lactancia materna: una guía para la profesión médica. 6ª edición. Londres: Mosby; 2005.
14. November 2017 ©Unicef UK www.unicef.org.uk/babyfriendly Registered charity numbers 1072612 (England and Wales) SC043677 (Scotland) Illustrations by Sarah-Jayne Mercer
15. Nutrition during lactation. Committee of the Institute of Medicine (USA) On the nutritional status during pregnancy and lactation. Washington (DC): National Academies Press (United States); 199
16. Casey C, et al. Ingesta de nutrientes por lactantes amamantados durante los primeros cinco días después del nacimiento. Revista Americana de Enfermedades de la Infancia. 1986; 140 : 933–936
17. Peroni, D.G., et al., *Colostrum-derived B and T cells as an extra-lymphoid compartment of effector cell populations in humans*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013. 26(2): p. 137-42.
18. Grabarics, M., et al., *Analytical characterization of human milk oligosaccharides - potential applications in pharmaceutical analysis*. J Pharm Biomed Anal, 2017. 146: p. 168-178.
19. Jenness R. The composition of human milk. Semin Perinatol. 1979 Jul;3(3):225-39.
20. Erney, R.M., et al., *Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000. 30(2): p. 181-92.

21. Witkowska-Zimny and Kaminska-El-Hassan Cellular & Molecular Biology Letters (2017) 22:11 DOI 10.1186/s11658-017-0042-4
22. Antonakou, A., et al., *Breast milk fat concentration and fatty acid pattern during the first six months in exclusively breastfeeding Greek women.* Eur J Nutr, 2013. 52(3): p. 963-73.
23. Ustundag B, Yilmaz E, Dogan Y, Akarsu S, Canatan H, Halifeoglu I, Cikim G, Aygun AD. Levels of cytokines (IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants. Mediators of inflammation. 2005; 2005(6):331– 336. [PubMed: 16489252]
24. Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, Perez-Cano FJ, Castell M, Moretones MG, LopezSabater MC, Franch A. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. The Journal of nutrition. 2011; 141(6):1181–1187. [PubMed: 21508211]
25. Ustundag, B., et al., *Levels of cytokines (IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants.* Mediators Inflamm, 2005. 2005(6): p. 331-6.
26. Mizuno K, Hatsuno M, Aikawa K, Takeichi H, Himi T, Kaneko A, Kodaira K, Takahashi H, Itabashi K. Mastitis is associated with IL-6 Levels and milk fat globule size in breast milk. J. Hum. Lact. 2012
27. Agarwal, S., et al., *Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations.* J Hum Lact, 2011. 27(2): p. 171-86.
28. Meki A-RMA, Saleem TH, Al-Ghazali MH, Sayed AA. Interleukins -6, -8 and -10 and tumor necrosis factor alpha and its soluble receptor I in human milk at different periods of lactation. Nutr. Res. 2003; 23:845–855
29. Michie, C.A., et al., *Physiological secretion of chemokines in human breast milk.* Eur Cytokine Netw, 1998. 9(2): p. 123-9.
30. Shiou, S.R., et al., *Erythropoietin protects intestinal epithelial barrier function and lowers the incidence of experimental neonatal necrotizing enterocolitis.* J Biol Chem, 2011. 286(14): p. 12123-32.
31. Meki A-RMA, Saleem TH, Al-Ghazali MH, Sayed AA. Interleukins -6, -8 and -10 and tumor necrosis factor alpha and its soluble receptor I in human milk at different periods of lactation. Nutr. Res. 2003; 23:845–855
32. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. Int Anesthesiol Clin 2007, 45(2): 27-
33. Lombardero, M., K. Kovacs, and B.W. Scheithauer, *Erythropoietin: a hormone with multiple functions.* Pathobiology, 2011. 78(1): p. 41-53.
34. Loui, A., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) levels in early and mature human milk from mothers of preterm versus term infants.* J Hum Lact, 2012. 28(4): p. 522-8.
35. Gilmore, W.S., et al., *Human milk contains granulocyte colony stimulating factor.* Eur J Clin Nutr, 1994. 48(3): p. 222-4.
36. Gersting, J.A., et al., *Bioavailability of granulocyte colony-stimulating factor administered enterally to suckling mice.* Pharmacol Res, 2003. 48(6): p. 643-7.
37. Houseknecht, K.L., et al., *The biology of leptin: a review.* J Anim Sci, 1998. 76(5): p. 1405-20.
38. Savino, F. and S.A. Liguori, *Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin.* Clin Nutr, 2008. 27(1): p. 42-7.
39. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals.* Nature, 1998. 395(6704): p. 763-70.

40. Fujinami, A., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin: resistin concentrations in normal subjects and patients with type 2 diabetes*. Clin Chim Acta, 2004. 339(1-2): p. 57-63.
41. Hosogai, N., et al., *Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation*. Diabetes, 2007. 56(4): p. 901-11.
42. Ouchi, N., et al., *Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease*. Curr Opin Lipidol, 2003. 14(6): p. 561-6.
43. Ouchi, N., et al., *Adipokines in inflammation and metabolic disease*. Nat Rev Immunol, 2011. 11(2): p. 85-97.
44. Witkowska-Zimny, M. and E. Kaminska-El-Hassan, *Cells of human breast milk*. Cell Mol Biol Lett, 2017. 22: p. 11.
45. Heikkila, M.P. and P.E. Saris, *Inhibition of Staphylococcus aureus by the commensal bacteria of human milk*. J Appl Microbiol, 2003. 95(3): p. 471-8.
46. Cabinian, A., et al., *Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant*. PLoS One, 2016. 11(6): p. e0156762.
47. Hassiotou, F. and D.T. Geddes, *Immune cell-mediated protection of the mammary gland and the infant during breastfeeding*. Adv Nutr, 2015. 6(3): p. 267-75.
48. Palmeira P, Carneiro-Sampaio M. Immunology of breast milk. Rev Assoc Med Bras (1992) 2016, 62(6): 584-593.
49. Lepage P, Van de Perre P. The immune system of breast milk: antimicrobial and anti-inflammatory properties. Adv Exp Med Biol 2012, 743: 121-137.
50. Goldman AS, Goldblum RM. Transferencia de leucocitos maternos al lactante por la leche humana . Curr Top Microbiol Immunol 1997; 222 : 205-13.
51. Michie CA. Los efectos a largo plazo de la lactancia materna: ¿un papel para las células en la leche materna? J Trop Pediatr 1998; 44 : 2-3
52. Sabbaj S, Ghosh MK, Edwards BH, Leeth R, Decker WD, Goepfert PA, Aldrovandi GM. Células T CD8 + específicas de antígeno derivadas de la leche materna: una población de células de memoria efectoras extralinfoides en humanos . J Immunol 2005;174 : 2951-6.
53. Tuailon E, Valea D, Becquart P, Al Tabaa Y, Meda N, Bollore K, Van de Perre P, Vendrell JP. Células B derivadas de la leche humana: una población de células de memoria conmutada altamente activada preparada para secretar anticuerpos . J Immunol 2009;182 : 7155-62.
54. Peroni DG, Chirumbolo S, Veneri D, Piacentini GL, Tenero L, Vella A, Ortolani R, Raffaelli R, Boner AL. Células B y T derivadas de calostro como un compartimento extra linfoide de poblaciones de células efectoras en humanos. J Matern Fetal Neonatal Med 2013;26 : 137-42.
55. Eglinton, Bachelor of Arts, Robertson, DM and Cummins, AG (1994) T-cell phenotype, soluble receptor levels and cytokine profile of human breast milk. Immunol. Cell Biol. 72: 306-313.
56. Ozkaragöz F, Rudloff HB, Rajaraman S, Mushtaha AA, Schmalstieg FC, Goldman AS. La motilidad de los macrófagos de la leche humana en geles de colágeno . Pediatr Res 1988;23 : 449-52.
57. Dickey WD, Rudloff HB, Goldman AS, Schmalstieg FC. Linfocitos portadores de uropodos humanos: aislamiento de un factor de la leche humana que anula la proteína inhibidora de los uropodos del suero humano . Biochem Biophys Res Commun 1981; 100 : 138-45.
59. Trend, S., et al., *Leukocyte Populations in Human Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry*. PLoS One, 2015. 10(8): p. e0135580.

60. Rodak, Bernadette F. (2005). «Parte II: Hematopoyesis». Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas (2 edición). Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana. pp. 134-142. ISBN 9789500618762
61. Actor, Jeffrey K. (2011). Elsevier Inc., ed. Elsevier's integrated review immunology and microbiology [Revisión integrada de Elsevier: inmunología y microbiología] (en inglés) (2 edición). Pensilvania, Estados Unidos: Elsevier Health Sciences. ISBN 9780323074476.
62. Palmeira P, Carneiro-Sampaio M. Immunology of breast milk. Rev Assoc Med Bras (1992) 2016, 62(6): 584-593.
63. Lepage P, Van de Perre P. The immune system of breast milk: antimicrobial and anti-inflammatory properties. Adv Exp Med Biol 2012, 743: 121-137.
64. Judith A. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity Fife. Mexico.
65. Sokol CL, Chu NQ, Yu S, Nish SA, Laufer TM, Medzhitov R. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. Nature Immunology 10:713-720, 2009.
66. Paulo M.M. Guedes, Fredy R.S. Gutierrez, Grace K. Silva, João S. Silva. Molecular markers for clinical forms of Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop - Vol: 42: Suplemento II, 2009.
68. Judith A. Owen, Jenni Punt, Sharon A. Stranford, . (2014). kuby. inmunología mexico: mcgraw-hill interamericana editores
69. Perrigoue, J.G., et al., MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. Nat Immunol, 2009. 10(7): p. 697-705.
70. Cerbulo-Vazquez, A., et al., Characterization of CD127(-) CD25(++) Treg from human colostrum. Am J Reprod Immunol, 2018. 79(2).
71. Soler, D.C. and T.S. McCormick, The dark side of regulatory T cells in psoriasis. J Invest Dermatol, 2011. 131(9): p. 1785-6.
72. 9681387Rech, A.J., et al., CD25 blockade depletes and selectively reprograms regulatory T cells in concert with immunotherapy in cancer patients. Sci Transl Med, 2012. 4(134): p. 134ra62.
74. Judith A. Owen, Jenni Punt, Sharon A. Stranford, . (2014). KUBY. INMUNOLOGÍA.. Mexico: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES
75. Zhdanova, Bachelor of Arts, Robertson, DM and Cummins, AG (1994) T-cell phenotype, soluble receptor levels and cytokine profile of human breast milk. Immunol. Cell Biol. 72: 306-313.
76. Zhdanova, Bachelor of Arts, Robertson, DM and Cummins, AG (1994) T-cell phenotype, soluble receptor levels and cytokine profile of human breast milk. Immunol. Cell Biol. 72: 306-313.
77. Yang, S.H., et al., The molecular basis of immune regulation in autoimmunity. Clin Sci (Lond), 2018. 132(1): p. 43-67.
78. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol, 2008. 8(7): p. 523-32.
79. Blumenfeld, S., E. Staun-Ram, and A. Miller, Fingolimod therapy modulates circulating B cell composition, increases B regulatory subsets and production of IL-10 and TGFbeta in patients with Multiple Sclerosis. J Autoimmun, 2016. 70: p. 40-51.
80. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. J Clin Immunol, 2008. 28(6): p. 647-59.
81. Blobel, G.C., W.P. Schiemann, and H.F. Lodish, Role of transforming growth factor beta in human disease. N Engl J Med, 2000. 342(18): p. 1350-8.
82. Wills-Karp M, Nathan A, Page K, Karp CL. New insights into innate immune mechanisms underlying allergenicity. Mucosal Immunol. 2010 Mar; 3(2):104-10. [PubMed: 20032970]

83. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 2012, 32(1): 23-63.
84. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. *Immunity*, 2004. 21(4): p. 589-601.
85. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 2012, 32(1): 23-63.
86. Chambers, C.A., et al., *CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy*. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 565-94.
87. B.T. and J.A. Bluestone, *Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways*. *Immunol Rev*, 2008. 224: p. 166-82.
88. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. *Annu Rev Immunol*, 2008. 26: p. 677-704.
89. Riley, J.L., *PD-1 signaling in primary T cells*. *Immunol Rev*, 2009. 229(1): p. 114-25.
90. Fife, B.T. and J.A. Bluestone, *Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways*. *Immunol Rev*, 2008. 224: p. 166-82.
91. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol* 2016, 39(1): 98-106.
92. Bryan DL, Hart PH, Forsyth KD, Gibson RA *Pediatr The immunomodulatory constituents of breast milk change in response to childhood bronchiolitis*. *Allergy Immunol*. 2007 Sep; 18 (6): 495-502.
93. Sinanoglou, V.J., et al. *Factors affecting human colostrum fatty acid profile: A case study*. *PLoS One* 2017 [cited 12 4]; 2017/04/15:[e0175817]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28410426>.
94. Sosa-Castillo, E., M. Rodriguez-Cruz, and C. Molto-Puigmarti, *Genomics of lactation: role of nutrigenomics and nutrigenetics in the fatty acid composition of human milk*. *Br J Nutr*, 2017. 118(3): p. 161-168.
95. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Obesidad y sobrepeso*.<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
96. Barker, D.J., *The fetal and infant origins of adult disease*. *BMJ*, 1990. 301(6761): p. 1111.
97. Whitaker, R.C., *Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy*. *Pediatrics*, 2004. 114(1): p. e29-36.
98. Lynch, C.M., et al., *Obesity and mode of delivery in primigravid and multigravid women*. *Am J Perinatol*, 2008. 25(3): p. 163-7.
99. Oken, E. and M.W. Gillman, *Fetal origins of obesity*. *Obes Res*, 2003. 11(4): p. 496-506.
100. *Addressing Chronic Malnutrition through Multi-Sectoral, Sustainable Approaches: A Review of the Causes and Consequences - Scientific Figure on ResearchGate*. Available from: https://www.researchgate.net/figure/The-UNICEF-conceptual-framework-of-undernutrition-is-shown-Source-UNICEF-Improving_fig1_265417741 [accessed 3 Dec, 2018]
101. Leddy, M.A., M.L. Power, and J. Schulkin, *The impact of maternal obesity on maternal and fetal health*. *Rev Obstet Gynecol*, 2008. 1(4): p. 170-8.
102. Rooney, B.L. and C.W. Schauburger, *Excess pregnancy weight gain and long-term obesity: one decade later*. *Obstet Gynecol*, 2002. 100(2): p. 245-52.
103. Leddy, M.A., M.L. Power, and J. Schulkin, *The impact of maternal obesity on maternal and fetal health*. *Rev Obstet Gynecol*, 2008. 1(4): p. 170-8.
104. Izaola, O., et al., *[Inflammation and obesity (lipoinflammation)]*. *Nutr Hosp*, 2015. 31(6): p. 2352-8.

105. King JC. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annu Rev Nutr* 2006; 26: 271–291
106. Catalano, P.M. and H.M. Ehrenberg, *The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring*. *BJOG*, 2006. 113(10): p. 1126-33.
107. Straughen, J.K., S. Trudeau, and V.K. Misra, *Changes in adipose tissue distribution during pregnancy in overweight and obese compared with normal weight women*. *Nutr Diabetes*, 2013. 3: p. e84.
108. World Health Organization. *Obesity: Preventing and managing the global epidemic*. Geneva: World Health Organization, 2000
109. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Obesidad y sobrepeso*. .. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
110. Wanderley, E.N. and V.A. Ferreira, [*Obesity: a plural perspective*]. *Cien Saude Colet*, 2010. 15(1): p. 185-94.
111. Popkin, B.M., *The nutrition transition and its health implications in lower-income countries*. *Public Health Nutr*, 1998. 1(1): p. 5-21.
112. Hanson, M., P. Gluckman, and F. Bustreo, *Obesity and the health of future generations*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016. 4(12): p. 966-967.
113. Heikkilä MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol*. 2003; 95(3):471-8.
114. Newburg DS. Are all human milks created equal? Variation in human milk oligosaccharides. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; 30(2):131-3.
115. Drake, A.J. and R.M. Reynolds, *Impact of maternal obesity on offspring obesity and cardiometabolic disease risk*. *Reproduction*, 2010. 140(3): p. 387-98.
116. Lepage P, Van de Perre P. The immune system of breast milk: antimicrobial and anti-inflammatory properties. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 743:121-37
117. Barros MD, Carneiro-Sampaio MMS. Milk composition of low birth weight infant mothers. *Acta Paediatr Scand*. 1984; 73:693-5
118. Rodriguez-Rodriguez, E., et al., [*Obesity, insulin resistance and increase in adipokines levels: importance of the diet and physical activity*]. *Nutr Hosp*, 2009. 24(4): p. 415-21.
119. Samad, F. and W. Ruf, *Inflammation, obesity, and thrombosis*. *Blood*, 2013. 122(20): p. 3415-22.
120. Claria, J., et al., *Resolvin D1 and resolvin D2 govern local inflammatory tone in obese fat*. *J Immunol*, 2012. 189(5): p. 2597-605.
121. Esquivel Solís, N.D., *MS actores asociados a la obesidad en mujeres en edad fértil** *Rev. costarric. salud pública* vol.13 n.25 San José Dec. 2004
122. P. Riobó, B. Fernández Bobadilla, M. Kozarcewski y J. M. Fernández Moya. *Obesidad en la mujer*. *Nutr. Hosp.* vol.18 no.5 Madrid sep./oct. 2003.
123. Esquivel Solís, N.D., *MS actores asociados a la obesidad en mujeres en edad fértil** *Rev. costarric. salud pública* vol.13 n.25 San José Dec. 2004
124. Oh, C.K., G.P. Geba, and N. Molfino, *Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma*. *Eur Respir Rev*, 2010. 19(115): p. 46-54.
125. Blum, J.W. and C.R. Baumrucker, *Insulin-like growth factors (IGFs), IGF binding proteins, and other endocrine factors in milk: role in the newborn*. *Adv Exp Med Biol*, 2008. 606: p. 397-422.
126. Kodo, K., et al., *Erythropoietin (EPO) ameliorates obesity and glucose homeostasis by promoting thermogenesis and endocrine function of classical brown adipose tissue (BAT) in diet-induced obese mice*. *PLoS One*, 2017. 12(3): p. e0173661.

127. Alnaeeli, M., et al., *Erythropoietin signaling: a novel regulator of white adipose tissue inflammation during diet-induced obesity*. *Diabetes*, 2014. 63(7): p. 2415-31.
128. Villa, P., et al., *Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis*. *J Exp Med*, 2003. 198(6): p. 971-5.
129. Nairz, M., et al., *Erythropoietin contrastingly affects bacterial infection and experimental colitis by inhibiting nuclear factor-kappaB-inducible immune pathways*. *Immunity*, 2011. 34(1): p. 61-74.
130. Hauner, H., K. Rohrig, and T. Petruschke, *Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) on human adipocyte development and function*. *Eur J Clin Invest*, 1995. 25(2): p. 90-6.
131. Kared, H., et al., *Role of GM-CSF in tolerance induction by mobilized hematopoietic progenitors*. *Blood*, 2008. 112(6): p. 2575-8.
132. Steppan, C.M., et al., *The hormone resistin links obesity to diabetes*. *Nature*, 2001. 409(6818): p. 307-12.
133. Samaha, F.F., et al., *Effects of rosiglitazone on lipids, adipokines, and inflammatory markers in nondiabetic patients with low high-density lipoprotein cholesterol and metabolic syndrome*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(3): p. 624-30.
134. Park, H.K. and R.S. Ahima, *Resistin in rodents and humans*. *Diabetes Metab J*, 2013. 37(6): p. 404-14.
135. Kusminski, C.M., P.G. McTernan, and S. Kumar, *Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes*. *Clin Sci (Lond)*, 2005. 109(3): p. 243-56.
136. Hanson, L.A., *Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1998. 81(6): p. 523-33; quiz 533-4, 537.
137. Barbi, J., D. Pardoll, and F. Pan, *Treg functional stability and its responsiveness to the microenvironment*. *Immunol Rev*, 2014. 259(1): p. 115-39.
138. Kateřina Kondělková, Doris Vokurková, Jan Krejsek Lenka Borská, Zdeněk Fiala, Ctirad Andrýs. **REGULATORY T CELLS (TREG) AND THEIR ROLES IN IMMUNE SYSTEM WITH RESPECT TO IMMUNOPATHOLOGICAL DISORDERS**. Charles University in Prague, Faculty of Medicine and University Hospital Hradec Králové, Czech Republic: Department of Clinical Immunology and Allergology; Institute of Pathological Physiology; Institute of Hygiene and Preventive Medicine. 2010;53(2):73–77
139. Grant, J., et al., *Validated protocol for FoxP3 reveals increased expression in type 1 diabetes patients*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2009. 76(2): p. 69-78.
140. Dingle, B.M., et al., *FoxP3(+) regulatory T cells attenuate experimental necrotizing enterocolitis*. *PLoS One*, 2013. 8(12): p. e82963.
141. Altmann, D.M., *Regulatory T-cells: receptors, repertoires and roles in disease*. *Immunology*, 2018. 155(2): p. 153-154.
142. Haase, S., et al., *Impacts of microbiome metabolites on immune regulation and autoimmunity*. *Immunology*, 2018. 154(2): p. 230-238.
143. Meng, S.S., et al., *Maternal allergic disease history affects childhood allergy development through impairment of neonatal regulatory T-cells*. *Respir Res*, 2016. 17(1): p. 114.
144. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151–64.

145. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med*, 2000. 192(7): p. 1027-34.
146. Collins, M., V. Ling, and B.M. Carreno, *The B7 family of immune-regulatory ligands. Genome Biol*, 2005. 6(6): p. 223.
147. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet*, 2001. 27(1): p. 20-1.
148. Krummel, M.F. and J.P. Allison, *CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. J Exp Med*, 1995. 182(2): p. 459-65.
149. Fernández-Ponce, Cecilia; Hernández-Martínez, Juan David; Silvera-Redondo, Carlos. *Ctla-4, una molécula que inhibe la activación de los linfocitos T. Salud Uninorte*, vol. 22, núm. 2, julio-diciembre, 2006, pp. 168-181. Universidad del Norte Barranquilla, Colombia.
150. Levings, M.K., et al., *The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. Int Arch Allergy Immunol*, 2002. 129(4): p. 263-76.
151. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 683-765.
152. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta in T-cell biology. Nat Rev Immunol*, 2002. 2(1): p. 46-53.
153. Catalan, V., et al., *Adipose tissue immunity and cancer. Front Physiol*, 2013. 4: p. 275.
154. Khodabakhshi, A., et al., *Comparative measurement of ghrelin, leptin, adiponectin, EGF and IGF-1 in breast milk of mothers with overweight/obese and normal-weight infants. Eur J Clin Nutr*, 2015. 69(5): p. 614-8.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

TEXTO DECLARATIVO

Yo _____ declaro libremente que he sido informada de manera verbal y por escrito de los aspectos que se mencionan a continuación de la investigación titulada **“Influencia de los linfocitos T reguladores de calostro humano en la colonización de los géneros bacterianos *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* en el intestino de neonatos término y pre-término”**

- Justificación y objetivos de la investigación
- Procedimientos que van a usarse y su propósito con un lenguaje entendible para mí (representado), así como las responsabilidades que adquiero al participar
- Molestias y riesgos esperados
- Beneficios que puedan obtenerse
- La disponibilidad de tratamiento médico a la que tendría derecho por parte de la institución de atención a la salud
- El compromiso de proporcionarme información actualizada obtenida durante el estudio, aunque esta pudiera afectar mi voluntad para continuar participando
- Que si existen gastos adicionales, derivados de este estudio de investigación, estos serán absueltos por el presupuesto de la misma
- La seguridad de que no se me identificará y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con mi privacidad de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares. Capítulo I de los Principios de Protección de Datos Personales, Artículo 6, 7, 8 y 9: y aviso de privacidad Institucional
- La libertad de retirar mi consentimiento in en cualquier momento sin que por ello se creen prejuicios para continuar mu cuidado y tratamientos
- Que en caso de no aceptar participar en la investigación no existirá ninguna responsabilidad, ni se verán afectados los derechos de atención médica presentes o futura
- La garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta o duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados a la investigación

Por lo anterior si ____ o no____ estoy de acuerdo en participar en la investigación arriba señalada firmando la declaración de consentimiento informado

Nombre y firma del sujeto de investigación o su representante legal
Testigo 1

Nombre y firma Parentesco

Domicilio
Testigo 2

Nombre y firma Parentesco

Domicilio

_____ Ciudad de México a _____ de _____
de _____

Nombre y firma del investigador principal

Material Suplementario

Pruebas de correlación entre Edad y parámetros evaluados

Parámetro	Edad (años)		Parámetro	Edad (años)	
	P	r		P	r
Tiempo de gestación	0.288	-0.184	IFN- γ	0.179	-0.271
Tiempo de puerperio	0.917	-0.018	Adiponectina	0.505	0.142
Linfocitos Totales	0.232	0.297	Adipsina	0.299	0.221
Linfocitos Th	0.282	0.322	Leptina	0.319	-0.212
Linfocitos Treg	0.232	0.356	Resistina	0.217	0.261
CTLA-4	0.208	0.358	Angiopoietin-2	0.820	0.042
PD-1	0.255	0.325	EGF	0.965	0.008
TGF- β	0.953	0.018	EPO	0.905	-0.022
IL-10	0.809	0.074	FGF-basic	0.588	-0.101
IL-5	0.620	-0.092	G-CSF	0.635	-0.088
IL-13	0.080	-0.318	GM-CSF	0.145	-0.272
IL-2	0.274	-0.232	HGF	0.539	0.123
IL-6	0.141	0.296	M-CSF	0.115	0.329
IL-9	0.887	-0.026	PDGF-AA	0.641	0.102
IL-10	0.081	-0.348	PDGF-BB	0.762	0.059
IFN- γ	0.948	-0.012	SCF	0.610	-0.104
TNF- α	0.613	0.104	TGF- α	0.671	-0.104
IL-17A	0.360	-0.186	VEGF	0.6518	-0.1223
IL-17F	0.619	-0.092			
IL-4	0.430	-0.164			
IL-21	0.926	-0.017			
IL-22	0.732	0.066			

Pruebas de correlación entre la edad y los parámetros evaluados. Prueba de correlación de Pearson.