



**Universitat de les
Illes Balears**

TESIS DOCTORAL

2016

**ESTUDIO NUTRIGENÓMICO DEL POTENCIAL
IMPACTO DE LA DIETA SOBRE LA
COMPOSICIÓN DE LA LECHE MATERNA Y
DESARROLLO DEL NEONATO**

Rocío Zamanillo Campos



**Universitat de les
Illes Balears**

TESIS DOCTORAL

2016

**Programa de Doctorado en Nutrigenómica y Nutrición
Personalizada**

**ESTUDIO NUTRIGENÓMICO DEL POTENCIAL
IMPACTO DE LA DIETA SOBRE LA
COMPOSICIÓN DE LA LECHE MATERNA Y
DESARROLLO DEL NEONATO**

Rocío Zamanillo Campos

Directores: Francisca Serra Vich y Andreu Palou Oliver

Doctora por la Universitat de les Illes Balears

Con el consentimiento de los directores

Dra. Francisca Serra Vich

Catedrática de Universidad de Nutrición y Bromatología

Dr. Andreu Palou Oliver

Catedrático de Universidad de Bioquímica y Biología
Molecular

La candidata a doctora

Rocío Zamanillo Campos

La paciencia es la madre de la ciencia

La palabra "paciencia" es de origen latino (patientia). Significa tolerar o soportar una situación no agradable manteniendo la calma. Se asocia con la espera de un cambio favorable y con una actitud perseverante.

Paciencia es dedicar tiempo a diario a soñar tus propios sueños y desarrollar la confianza en ti mismo para convertir tus deseos en realidad. Paciencia es ser complaciente y tener la fe necesaria para aferrarte a tus anhelos, aun cuando pasan los días sin poder ver de qué manera se harán realidad. De acuerdo con la tradición filosófica, "es la constancia valerosa que se opone al mal, y a pesar de lo que sufra el hombre no se deja dominar por él".

Agradecimientos

El trabajo y esfuerzo que esta tesis doctoral contiene en sus entrañas es el fruto de muchas horas de aprendizaje y evolución personal que obviamente he compartido con muchas personas.

A mi pareja Miguel por haberme conocido como estudiante de doctorado y haber estado en todos los momentos hasta convertirme en doctora. Por tu constancia y presencia en los momentos más duros, por tu apoyo, inteligencia y saber estar.

A mis padres Carlos y Tomy, un pilar emocional, intelectual, económico por qué no decirlo y sobretodo un faro que siempre alumbra todos mis caminos.

A mi hermana Marina por su alegría de vivir y esa inocencia que refrescan la juventud y motiva a disfrutar el momento. Por sus sonrisas infinitas.

A mis amigos más cercanos Irene, Anahí, Leila, Nate, Toni, Mike, Yasmin, Natalia, Loli, Amanda, María, Mónica, Mar, Mabel, Alice, Petar, Maite, Cristina, Anja, Aida, Rosa, Jordi, Carola, Marta, Isidro y Lolo, por haberme apoyado siempre en este proyecto y ser una válvula de escape, una fuente de enriquecimiento personal, un punto de partida para otras cosas distintas del trabajo y del esfuerzo. En definitiva, por su amistad.

A mis tutores de tesis Francisca Serra y Andreu Palou, por la posibilidad ofrecida para el desarrollo de esta investigación y aprendizaje, así como toda la formación recibida durante un no corto periodo de tiempo y por tanto de mi vida.

A los componentes del Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología, por su compañía, especialmente aquellas personas con las que he podido compartir momentos de laboratorio, comidas de tupper, viajes, SPSS y otras rarezas nutrigenómicas: Alice, Nora, Ana Paula, Hana, Petar, Jadwiga, Rubén, Nara, Yuri, Estefanía, Xisco, Enzo, Paula, Joan, Joana, Teresa y Sara.

A mi tutor de la estancia del doctorado Miguel Ángel Juárez que creyó en mi propuesta para formarme en estadística avanzada sin dudarlo desde el primer momento y hasta el final.

A Dora y Aina, dos figuras que llegaron por sorpresa a mi vida, pero sin las cuales no me habría visto capaz de terminar este camino, gracias por vuestro apoyo en metodología estadística y en todo lo demás.

A mí misma y mi entorno más cercano por haber crecido y construido un camino en la vida feliz, digno, culto, arraigado, lleno de orgullo, satisfacción, humor, alegría, equilibrio y serenidad.

Índice

TESIS DOCTORAL	1
Resumen	13
Resum	15
Summary	17
Acrónimos y abreviaturas	19
1. Introducción	25
<i>1.1 La obesidad en el siglo XXI</i>	25
<i>1.2 La nutrición durante la lactancia materna</i>	29
1.2.1 Importancia de la dieta materna durante la lactancia	29
1.2.2 Consumo de suplementos	31
1.2.3 La composición de la leche materna	32
<i>1.3 Composición de la leche materna y crecimiento infantil</i>	39
2. Hipótesis y Objetivos	41
3. Metodología	43
<i>3.1. Diseño y características del estudio Nutrigen-11</i>	43
3.1.1 Recolección de información antropométrica y nutricional	43
3.1.2 Recolección de las muestras de leche materna	44
<i>3.2 Seguimiento del crecimiento infantil de 0 a 2 años</i>	45
3.2.1 Los estándares para el crecimiento infantil de la OMS	45
3.2.2 El peso al nacer	47
3.2.3 El Índice de Masa Corporal y el Índice Ponderal	48
3.2.4 La velocidad de crecimiento	49
<i>3.3 Valoración nutricional</i>	50
<i>3.4 Análisis de componentes de interés en leche materna</i>	58
3.4.1 Triglicéridos y ácidos grasos	58
3.4.2 Proteínas de interés y aminoácidos	59
3.4.3 Minerales	60
3.4.4 Precursores de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)	60
3.4.5 MicroARNs	61
<i>3.5 Análisis estadístico de los resultados</i>	66
3.5.2 Software utilizado	66
3.5.3 Factores de interés y variables de confusión del estudio	67
	11

3.5.4 Tratamiento estadístico de las variables de estudio	67
3.5.5 Análisis exploratorio de datos	68
3.5.6 Análisis estadísticos complejos	69
4. Resultados y Discusión	73
4.1 <i>Caracterización de la población de estudio</i>	73
4.1.1 Características antropométricas y de crecimiento infantil	77
4.2 <i>Valoración de la ingesta de alimentos y el estatus nutricional materno</i>	87
4.2.1 Distribución de la ingesta energética y adherencia a la dieta mediterránea	87
4.2.2 Ingesta de macronutrientes y calidad de la dieta	93
4.2.3 Ingesta de micronutrientes y compuestos bioactivos	106
4.2.4 Identificación de patrones de alimentación específicos	130
4.2.5 Diferencias en las ingestas por grupos de estudio	135
4.3 <i>Caracterización de la leche materna y evolución durante los primeros tres meses de lactancia</i>	137
4.3.1 Evolución de la composición en lípidos: triglicéridos, ácidos grasos no esterificados y perfil de ácidos grasos individuales	137
4.3.2 Evolución del contenido en proteínas totales, proteínas bioactivas y aminoácidos libres	166
4.3.3 Evolución de la concentración de minerales	199
4.3.4 Concentración de los precursores de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)	211
4.3.5 Evolución del contenido de ARNs de pequeño tamaño y microARNs específicos	215
4.4 <i>Interconexiones nutricionales durante la lactancia materna que podrían predisponer a la obesidad en la edad adulta</i>	235
4.4.1 Influencia de la dieta materna sobre la composición de la leche	235
4.4.2 Correlograma de las interconexiones Dieta materna – Leche madura – Crecimiento Infantil	242
4.4.3 Potenciales mediadores nutrigenómicos de la predisposición a la obesidad durante la lactancia materna	245
5. Recapitulación	261
6. Limitaciones del estudio	270
7. Conclusiones / Conclusions	272
8. Bibliografía	278

Resumen

Frenar la expansión de la pandemia actual que supone la obesidad es uno de los retos científicos de nuestro tiempo. El desequilibrio energético asociado a ingestas por encima de las necesidades y/o a un gasto energético insuficiente, es una de sus causas mejor asentada. Si bien, la transmisión inter-generacional de la obesidad materna y la programación metabólica en etapas tempranas son factores relevantes que requieren de más estudio y caracterización para avalar nuevas estrategias preventivas. La lactancia constituye una etapa crítica en el desarrollo del neonato ya que, mediante su composición en nutrientes y otras moléculas bioactivas, la leche permite transferir información de la madre al hijo y programarlo para una buena adaptación al entorno. Además, la composición de la leche materna está modulada por la dieta que lleva a cabo la mujer durante la lactancia y seguramente también por su estatus nutricional previamente conformado a lo largo de su vida. Esta tesis analiza el potencial efecto de la dieta materna en la composición de su leche y sobre el desarrollo infantil hasta los dos años. Para ello se ha reclutado una cohorte de 59 parejas madre-hijo/a que vivían en Mallorca entre 2011 y 2014 en un diseño de carácter observacional, se ha caracterizado la población de estudio recogiendo variables antropométricas maternas y de crecimiento infantil de 0 a 2 años y se ha valorado el estatus nutricional durante los primeros tres meses de lactancia para cada uno de los cuales también se ha determinado la composición de triglicéridos, ácidos grasos no esterificados totales, el perfil de ácidos grasos individuales, proteínas totales, leptina, adiponectina, lactoferrina, lisozima, inmunoglobulina A, aminoácidos libres, los minerales calcio, magnesio, sodio, potasio, fósforo y azufre, los precursores de la nicotinamida adenina dinucleótido y una batería de microARNs seleccionados en función de sus potenciales dianas de acción así como su presencia en leche materna. Los resultados han puesto de manifiesto que el sobrepeso y la obesidad maternas durante la lactancia ($IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$) afecta a la evolución del peso infantil y ello viene modulado también por el sexo, la estación del nacimiento, la edad gestacional y ser o no primípara. En relación a las características de la dieta de la población estudiada, se ha identificado un estatus nutricional similar al de la población de mujeres españolas del mismo rango de edad, pero se observó riesgo por deficiencia en las ingestas de vitaminas B9, D y E y los minerales calcio, zinc y yodo, así como por exceso para las ingestas de vitamina B3 y sodio al adecuar las recomendaciones a la etapa fisiológica de lactancia. También hemos detectado ingestas altas (el doble o más de las recomendaciones respectivas) para la vitamina B12, vitamina K, el hierro y el fósforo, pero bajas (inadecuadas por defecto) para las vitaminas A, B5 y B8 en una proporción no despreciable de la población estudiada. Se observó la suplementación, aparentemente arbitraria, con complejos multinutriente en una parte significativa de la población y que, en todo caso, no respondía a sus necesidades reales de acuerdo a criterios exclusivamente nutricionales. La composición de la leche materna madura se

asoció con el Índice de Masa Corporal, la dieta y la edad materna, la ganancia de peso durante el embarazo, el tipo de parto, ser o no primípara, la estación en la que tuvo lugar el parto, la edad gestacional, el peso al nacer, la etapa de lactancia, el tipo de lactancia, el sexo del lactante y el crecimiento infantil. Se ha efectuado un análisis integrado de las diferencias y correlaciones halladas y el uso de modelos estadísticos ha permitido elaborar la propuesta de un conjunto de componentes de la dieta (isoleucina, almidón, fitoesteroles y vitamina D) y de la leche materna (sodio, calcio, leptina, ácido oleico, ácido glutámico, miR-27a y miR-27b) como moléculas bioactivas con potenciales funciones en la programación temprana de la obesidad durante la lactancia.

Resum

Frenar l'expansió de la pandèmia actual que suposa l'obesitat és un dels reptes científics del nostre temps. El desequilibri energètic associat a ingestes per sobre de les necessitats i/o a una despesa energètica insuficient, és una de les causes millor establertes. No obstant, la transmissió inter-generacional de l'obesitat materna durant el procés reproductiu, juntament amb la programació metabòlica a etapes primerenques, són factors rellevants que s'haurien d'estudiar i caracteritzar més a fons per avalar noves estratègies preventives. La lactància constitueix una etapa crítica en el desenvolupament del nounat ja que, mitjançant la seva composició en nutrients i altres molècules bioactives, la llet permet transferir informació de la mare al fill i programar-lo per a una bona adaptació a l'entorn. A més, la composició de la llet materna està modulada per la dieta que porta a terme la dona durant la lactància i segurament també pel seu estatus nutricional prèviament conformat al llarg de la seva vida. Aquesta tesi analitza el potencial efecte de la dieta en la composició de la llet materna i el desenvolupament infantil fins als dos anys. Amb aquest objectiu es va reclutar una cohort de 59 parelles mare-fill/a que vivien a Mallorca entre 2011 i 2014 en un disseny de caràcter observacional. Es va caracteritzar la població d'estudi recollint variables antropomètriques maternes i de creixement infantil de 0 a 2 anys i es va valorar l'estatus nutricional durant els primers tres mesos de lactància. Així mateix, per a cada un dels mesos es va determinar la composició de triglicèrids, àcids grassos no esterificats totals, el perfil d'àcids grassos individuals, proteïnes totals, leptina, adiponectina, lactoferrina, lisozima, immunoglobulina A, aminoàcids lliures, els minerals calci, magnesi, sodi, potassi, fòsfor i sofre, els precursors de la nicotinamida adenina dinucleòtid i una bateria de microARNs seleccionats en funció de les seves potencials dianes d'acció així com la seva presència en la llet materna. Els resultats van posar de manifest que el sobrepès i l'obesitat maternes durant la lactància ($IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$) afecten l'evolució del pes infantil i aquest darrer també ve modulats pel sexe, l'estació del naixement, l'edat gestacional i ser o no primípara. En relació a les característiques de la dieta de la població estudiada, s'ha identificat un estatus nutricional similar al de la població de dones espanyoles del mateix rang d'edat, però es va observar un risc per deficiència en les ingestes de vitamines B9, D i E i els minerals calci, zinc i iode, així com un excés per a les ingestes de vitamina B3 i sodi en adequar les recomanacions a l'etapa fisiològica de lactància. També vàrem detectar ingestes altes (el doble o més de les recomanacions respectives) per a la vitamina B12, vitamina K, el ferro i el fòsfor però baixes (inadequades per defecte) per a les vitamines A, B5 i B8 en una proporció no menyspreable de la població estudiada. Es va observar la suplementació, aparentment arbitrària, amb complexos multinutrient en una part significativa de la població i que, en tot cas, no responia a les seves necessitats reals d'acord amb criteris exclusivament nutricionals. La composició de la llet materna madura es va associar amb l'Índex de Massa Corporal, la dieta i l'edat materna, el

guany de pes durant l'embaràs, el tipus de part, ser o no primípara, l'estació en que va tenir lloc el part, l'edat gestacional, el pes en néixer, l'etapa de lactància, el tipus de lactància, el sexe del lactant i el creixement infantil. Es va portar a terme una anàlisi integrada de les diferències i correlacions trobades i l'ús de models estadístics ha permès elaborar la proposta d'un conjunt de components de la dieta (isoleucina, midó, fitosterols i vitamina D) i de la llet materna (sodi, calci, leptina, àcid oleic, àcid glutàmic, miR-27a i miR-27b) com unes molècules bioactives amb potencials funcions en la programació primerenca de l'obesitat durant la lactància.

Summary

Prevention of the current pandemic of obesity is one of the scientific challenges of our time. Energy imbalance as a consequence of caloric intakes above needs and/or insufficient energy expenditure is one of the best established causes of obesity. However, inter-generational transmission of maternal obesity through the reproductive process and metabolic programming in early stages are relevant factors that require further study and characterization to endorse new preventive strategies. Breastfeeding is a critical stage in the development of the newborn because milk can transfer information from mother to child via its composition in nutrients and other bioactive molecules, thus programming the adaptation to the environment. In addition, the composition of breast milk is modulated by maternal diet during lactation and probably also by the nutritional status preformed throughout her life. This thesis analyses the potential effect of maternal diet on the composition of human milk and infant development up to two years of age. For this, we recruited a cohort of 59 mother-infant pairs living in Mallorca between 2011 and 2014 in an observational study design. The study population was characterized by considering maternal anthropometric variables and infant growth up to two years of age. Maternal nutritional status was evaluated during the first three months of lactation; for each of these, triglyceride composition, total non-esterified fatty acids, the profile of individual fatty acid, total protein, leptin, adiponectin, lactoferrin, lysozyme, immunoglobulin A, free amino acids, the minerals calcium, magnesium, sodium, potassium, phosphorus and sulfur, the precursor of nicotinamide adenine dinucleotide and a battery of microRNAs selected based on their potential targets and their presence in milk was determined. Results show that overweight and maternal obesity during lactation ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) affects the evolution of infant weight and growth was also modulated by sex, season of birth, gestational age and being or not being primiparous. Regarding the characteristics of the diet, the studied population presented a nutritional status similar to that of Spanish women in the same age range. However, a risk of deficiency was observed for vitamins B9, D and E and minerals calcium, zinc and iodine, as well as an excessive intake of vitamin B3 and sodium when recommendations were adapted to the physiological stage of lactation. We have also detected high intakes (twice or more of the respective recommendations) for vitamin B12, vitamin K, iron and phosphorus but low (inadequate by default) for vitamins A, B5 and B8 in a large proportion of the population studied. Supplementation with multinutrient complexes was observed in a significant part of the studied population and it did not appear to respond to their needs according to nutritional criteria. The composition of mature breast milk was associated with body mass index, diet and maternal age, weight gain during pregnancy, type of delivery, being or not being primiparous, the season in which the birth took place, gestational age, birth weight, stage of lactation, type of feeding, sex of the infant and growth rate. Integrated analysis of the differences and correlations

found was performed. This, together with the use of statistical models, has allowed for a set of dietary (isoleucine, starch, phytosterols and vitamin D) and breast milk components (sodium, calcium, leptin, oleic acid, glutamate, threonine, miR-27a and miR-27b) to be defined as bioactive molecules with potential roles in early programming of obesity during lactation.

Acrónimos y abreviaturas

Aa Aminoácido

AA Ácido araquidónico

AaE Aminoácidos esenciales

AaL Aminoácidos libres

AaLN Aminoácidos de cadena neutra larga

AaLT Aminoácidos libres totales

AaNE Aminoácidos no esenciales

AaR Aminoácidos ramificados

AaS Aminoácidos sulfurados

AaSE Aminoácidos semi-esenciales

AaT Aminoácidos totales

ADN Ácido desoxirribonucleico

AGCC Ácidos grasos de cadena corta

AGCL Ácidos grasos de cadena larga

AGCM Ácidos grasos de cadena media

AGMI Ácidos grasos monoinsaturados

AGNE Ácidos grasos no esterificados

AGPI Ácidos grasos poliinsaturados

AGS Ácidos grasos saturados

AGw6 Ácidos grasos Omega 6

AIs *Adequate Intakes*, Ingestas adecuadas (IoM y EFSA)

AIC *Akaike Information Criterion*, Criterio de información de Akaike

Al Aluminio

ALA Ácido linolénico

ANOVA Análisis de la varianza

ARA Ácido araquidónico

ARN Ácido ribonucleico

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

Br Bromo

Ca Calcio

CAIB Comunidad Autónoma de las Islas Baleares

CDC *Centers for Disease Control and Prevention*, Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de Norte América

CFCA Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos

Cl Cloro

cm centímetros

Cr Cromo

Cu Cobre

DE Desviación estándar de la media

DPA Ácido docosapentaenoico

DHA Ácido docosahexaenoico

DRI *Dietary Reference Intakes*, Ingestas Diarias de Referencia (IoM)

EARs *Estimated Average Requirement*, Requerimientos medios estimados (IoM)

EERs *Estimated Energy Requirements*, Requerimientos estimados de energía (IoM)

EFSA *European Food Safety Authority*, Agencia Europea de Seguridad Alimentaria

EG Edad gestacional

EN Equivalentes de niacina

ENIDE Encuesta Nacional de Ingesta Dietética

EPA Ácido eicosapentaenoico

ER Equivalentes de retinol

F Flúor

Fe Hierro

GP Ganancia de peso con el embarazo

I Yodo

IDRs Ingestas Diarias Recomendadas para la población española

IgA Inmunoglobulina A

IMC Índice de masa corporal

IoM *Institute of Medicine*, Instituto de Medicina de los Estados Unidos de Norte América

IOTF *International Obesity Task Force*, Grupo de trabajo internacional para el estudio de la obesidad

K Potasio

kg kilogramos

LA Ácido linoleico

LdC Límite de Concordancia

MDS *Mediterranean Diet Score*, Índice de adherencia a la dieta mediterránea

Mg Magnesio

microARNs Ácidos ribonucleicos de entre 10 y 40 nucleótidos

mL mililitros

MLM Modelo Lineal Mixto

Mn Manganeseo

Na Sodio

NA Ácido nicotínico

NAD Nicotinamida adenina dinucleótido

NAM Nicotinamida

NAMPT Nicotinamida fosforibosiltransferasa

NMN Nicotinamida mononucleótido

Ni Níquel

NR Nicotinamida ribósido

nt nucleótido

OMS Organización Mundial de la Salud

P Fósforo

P1M Peso mes 1 tras el parto

PAE Peso antes del embarazo

PCA *Principal Component Analysis*, Análisis de componentes principales

PCR *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa

PN Peso al nacer

PNCS Polisacáridos no celulósicos solubles

PNCI Polisacáridos no celulósicos insolubles

PRIs *Population Reference Intakes*, Ingestas de referencia para la población (EFSA)

R24h Recordatorio de 24 horas

RDAs *Recommended Dietary Allowances*, Ingestas diarias recomendadas (IoM)

REDOX Reacciones de reducción-oxidación

RT-qPCR Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa

Se Selenio

SENC Sociedad Española de Nutrición Comunitaria

smallARNs Ácido ribonucleico de <200 nucleótidos

TG Triglicéridos

TRANS Ácidos grasos trans

Trp/AaLN Ratio triptófano/aminoácidos de cadena neutra larga (tirosina + fenilalanina + leucina + isoleucina + valina)

UI Unidades internacionales

UL *Tolerable Upper Level Intake*, Límite de ingesta máxima permitido

ur unidades relativas

vs versus

zlen z-scores longitud o talla para la edad

zwei z-scores peso para la edad

zwfl z-scores peso para la talla

zbmi z-scores IMC para la edad

zhc z-scores perímetro cefálico para la edad

Zn Zinc

1. Introducción

1.1 La obesidad en el siglo XXI

La obesidad es una enfermedad compleja y multifactorial asociada a factores genéticos y ambientales y caracterizada por una composición corporal cuyo contenido graso supera un estándar prefijado según altura, edad y sexo. En población adulta se tipifica como la presencia de un Índice de Masa Corporal (IMC) con un valor igual o superior a 30 (sobrepeso a partir de 25), mientras que en población infantil se utilizan como referencia las curvas de IMC específicas para la edad y el sexo. Si excede el percentil 95 tendremos una situación clínica de obesidad (percentil 85 para el nivel de sobrepeso) (1).

La obesidad es una de las enfermedades que más se ha incrementado en las últimas décadas (2) y que constituye un factor de riesgo independiente de la mortalidad mundial por todas las causas (3). Además, padecer sobrepeso u obesidad favorece el desarrollo de diabetes, cardiopatías isquémicas (4), determinados cánceres (5) y se ha relacionado con la artrosis (6), la osteoporosis (7) y la insuficiencia respiratoria (8) entre otras patologías, por lo que supone una merma de la salud y la calidad de vida de las personas muy importante.

En base a las estimaciones más recientes de los países de la Unión Europea (UE), el sobrepeso afecta a un 30-70% de la población adulta, y la obesidad alrededor del 10-30 % (9). Concretamente en España, los datos obtenidos en la Encuesta Nacional de Salud de 2009 pusieron en evidencia una prevalencia del 16% de obesidad con un ritmo creciente de casi dos puntos porcentuales desde el año 2001 (1). Los resultados de dicha encuesta pusieron de manifiesto que las mujeres presentan una mayor prevalencia que los hombres, al igual que los datos reportados para 19.2 millones de individuos de cuatro continentes distintos (2).

Como consecuencia de ello encontramos que en las últimas décadas el número de mujeres en edad fértil que durante el embarazo o la lactancia presentan una situación de sobrepeso u obesidad se ha visto fuertemente incrementado. Este hecho plantea la posibilidad de que la alta prevalencia de esta enfermedad se deba en parte a la transmisión intergeneracional de la obesidad mediante mecanismos nutrie-pigenéticos y de programación metabólica perinatal. De hecho, la obesidad infantil, con un 13.9% de prevalencia en España (10), se ha visto incrementada en un 60% en los últimos 30 años a nivel mundial (11), lo cual ha llevado a plantear al Dr. Carmona, Ex Director General de los Servicios de Salud de los Estados Unidos, que en las próximas generaciones por primera vez en la historia los hijos podrían vivir menos años que sus padres (12).

Por otro lado, es de destacar que los costes asociados a la obesidad superan con holgura los relacionados con el tabaquismo y el alcohol juntos (13, 14), por lo que, según la Organización

Mundial de la Salud (OMS), la lucha eficaz y eficiente contra la epidemia que supone la obesidad constituye uno de los principales retos para el avance de la sociedad en el siglo XXI (15). En este sentido, la prevención está reconocida como uno de los métodos más eficaces y económicos y constituye una prioridad en materia de salud pública (16-18).

En algunas etapas de la vida, especialmente en el embarazo y la lactancia, la situación nutricional de la madre afecta la salud presente y futura de su descendencia, por lo que asegurar un estatus nutricional adecuado y óptimo de las mujeres en etapas perinatales puede constituir un mecanismo para frenar y prevenir el desarrollo de obesidad de las generaciones futuras (19-21).

La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre las calorías ingeridas y las gastadas. Según las estimaciones de la OMS (22), en el mundo se ha producido un aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos que son ricos en grasa, sal y azúcares pero pobres en vitaminas, minerales y otros micronutrientes; simultáneamente se ha producido un descenso en la actividad física como resultado de la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, de los nuevos modos de desplazamiento y de una creciente urbanización.

Sin embargo, la obesidad también puede tener una cierta componente genética, con cientos de genes, marcadores y regiones cromosómicas que se han asociado a los fenotipos de obesidad en humanos (23-26). Hasta el momento, se han descrito varias formas raras de obesidad monogénica en humanos, causadas por la mutación o alteración en la secuencia de ADN de un solo gen, encontrándose mutaciones para los genes que codifican para la leptina, su receptor, la pro-opiomelanocortina, la pro-hormona convertasa-1 y el receptor de la melanocortina-4 (27). Todas estas formas de obesidad se hallan asociadas con el desarrollo de obesidad mórbida juvenil. Si bien, la obesidad más frecuente es de naturaleza poligénica, asociada a diferentes localizaciones (loci) de los cromosomas. Aunque el desequilibrio energético sigue siendo la causa más reconocida, actualmente se ha abierto un gran abanico de otros posibles factores con notoria influencia sobre la alta prevalencia de la obesidad y sus comorbilidades asociadas (28).

Entre ellos, la dieta materna durante el embarazo y/o la lactancia y el tipo de lactancia recibida son factores exógenos implicados en la programación temprana de la obesidad. De hecho, la lactancia materna exclusiva se recomienda al menos durante los primeros seis meses de vida, ya que existe suficiente evidencia científica de su efecto protector frente al desarrollo de obesidad de la descendencia (11, 29, 30). En la actualidad se estima que la lactancia materna reduce la prevalencia de sobrepeso u obesidad infantil entre un 12% y un 24% en comparación con la lactancia artificial (31).

Entre las posibles explicaciones encontramos un aporte moderado y más adecuado de calorías y nutrientes así como una composición dinámica y cambiante en respuesta a la demanda del lactante. Contrariamente, la leche artificial o de fórmula aporta mayores niveles de grasas y proteínas, incluso por encima de las necesidades, lo cual se ha relacionado con un aumento de la adiposidad infantil (9, 32).

Además, la leche materna contiene componentes bioactivos (33, 34) que pueden ejercer distintas funciones entre las cuales encontramos la programación de la proliferación y la diferenciación de los adipocitos (31, 35), por lo que se trata de un fluido cuya composición va más allá de un papel nutricional; constituye una matriz de moléculas bioactivas con potenciales funciones sobre la programación temprana de la obesidad.

En la actualidad, la hipótesis del aporte temprano de proteínas diferencial entre leche materna y leche artificial, así como la hipótesis de la deficiencia de leptina que no se encuentra en ésta última, constituyen las dos teorías con más fuerza en la investigación de los mecanismos de la programación temprana de la obesidad durante la lactancia.

La programación temprana hace referencia al marco temporal que envuelve el desarrollo perinatal y los complejos sistemas metabólicos y funcionales que tienen lugar durante estas etapas pre- y postnatales hasta los dos años de edad. Así, las experiencias acontecidas en dicha etapa inducen cambios permanentes en la fisiología de la descendencia dejando una impronta metabólica que predispone en mayor o menor medida al desarrollo de enfermedades de esta índole en la edad adulta (28).

Este concepto fue introducido a raíz del estudio que los efectos de la hambruna holandesa de 1944 en mujeres embarazadas tuvo sobre su descendencia (36, 37). Así, observaron una mayor prevalencia de obesidad en la edad adulta en los hijos de madres que sufrieron una restricción calórica muy acusada durante el embarazo. Dicha observación introdujo un campo de investigación definido por primera vez por Hales y Barker en el año 1992 como los orígenes de la salud y la enfermedad, concepto que hace referencia a la relación entre los acontecimientos que se dan en las etapas perinatales, los factores que los afectan y su influencia sobre el estado de salud futura de la descendencia (38). Concretamente, estos investigadores introdujeron este concepto a través de la hipótesis del fenotipo ahorrador planteada ante las observaciones derivadas de un estudio epidemiológico que relacionó una ingesta insuficiente por parte de madres embarazadas, con un bajo peso al nacer de la descendencia y una mayor predisposición al desarrollo de alteraciones cardio-metabólicas en la edad adulta.

Como consecuencia de estos resultados, se ha podido explicar una parte de la prevalencia de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en la sociedad actual, que no podían ser

explicadas por diferencias en la dieta o el estilo de vida únicamente. A este fenómeno se le conoce hoy como “programación”.

Más recientemente, en 2003, tras la secuenciación completa del ADN humano (39, 40) se ha podido ahondar en el campo de la epigenética que propone las vías más probables de dicha programación.

La epigenética es el estudio de las funciones del epigenoma y el epigenoma es el conjunto de modificaciones químicas que determina la estructura y organización del material genético, que contribuyen al empaquetamiento del ADN y en definitiva a la regulación de la expresión génica junto con los mecanismos ampliamente descritos que suponen la descodificación del ADN mediante la transcripción y la traducción a proteínas. Estas modificaciones son específicas de los distintos tejidos, mayoritariamente se configuran durante la etapa perinatal y determinan el patrón de expresión génica del individuo; de modo que ante un genotipo son potencialmente factibles diferentes fenotipos. En dicho transcurso se ha propuesto a la dieta y la actividad física como potenciales factores ambientales que modulan la regulación metabólica mediante vías epigenéticas en etapas tempranas de la vida (41).

Las marcas o huellas epigenéticas más caracterizadas hasta la fecha son las modificaciones covalentes de forma directa sobre el ADN y la modificación de histonas. Además, recientemente han surgido un grupo de moléculas de ARN no codificante con funciones igualmente reguladoras de la expresión génica. De entre la multitud de ARN no codificantes, los de pequeño tamaño o microARNs han cobrado especial interés por su capacidad directa de represión de la traducción de los genes y su reciente descubrimiento en la leche materna (42, 43).

Los microARNs están constituidos por 22 nucleótidos en promedio. Su transcripción tiene lugar en el núcleo celular a partir del ADN, luego pasan al citoplasma en un proceso de maduración donde ayudados por un conjunto de proteínas específicas son capaces de unirse a ARN mensajeros (ARNm) con los que encajan por homología entre pares de bases. Una vez alcanzan su ARNm diana pueden degradar, bloquear o activar la traducción del material hereditario.

Los microARNs presentes en la leche materna parecen proceder de su síntesis en glándula mamaria (44) y se transportan dentro de los exosomas, unas pequeñas vesículas proteicas de unos 30-100nm derivadas de los endosomas (45, 46). Éstos resisten el pH ácido y las enzimas digestivas, por lo que podrían transferir su contenido a células diana contribuyendo así a una comunicación desde la madre al lactante con potenciales funciones aún hoy desconocidas (47-51).

A partir de las fuentes exógenas de microARNs para los lactantes (leche materna o artificial si los contuvieran), éstos podrían pasar al torrente circulatorio atravesando las paredes de las células epiteliales intestinales del tracto digestivo con la ayuda de los exosomas y otras microvesículas transportadoras, así como directamente desde las células presentes en la leche. Una vez alcanzan el torrente circulatorio pueden viajar hasta tejidos y órganos diana y efectuar su función.

Profundizar en los factores que influyen el contenido de microARNs específicos en leche materna, así como en sus funciones, es un campo de investigación creciente en la búsqueda de nuevos biomarcadores del binomio salud-enfermedad. Así mismo, la relación de algunos de ellos en la regulación de mecanismos involucrados en el desarrollo de la obesidad, apunta a este componente novel de la leche materna como un potencial mecanismo epigenético de programación temprana de la obesidad durante la lactancia.

1.2 La nutrición durante la lactancia materna

La nutrición es uno de los factores más importantes que influyen en el desarrollo perinatal, no solo por la función clásica de los nutrientes, sino especialmente porque pueden estar involucrados en los procesos de programación metabólica y modular el desarrollo infantil, lo cual implica alteraciones sobre la composición corporal.

Las investigaciones más recientes apuntan a la nutrición durante el embarazo y la lactancia como un factor importante en la programación de determinadas enfermedades en la descendencia, entre ellas la obesidad (15, 52-54). De hecho, las intervenciones preventivas de obesidad infantil más prometedoras son aquellas focalizadas en la dieta (55).

En este contexto, la dieta materna durante la lactancia es considerada una variable modificable con el potencial de influir en la salud futura de la descendencia.

1.2.1 Importancia de la dieta materna durante la lactancia

La alimentación de la madre durante la gestación y sus efectos sobre el desarrollo de obesidad en la prole ha sido más estudiada que la alimentación durante la lactancia (56). Durante la lactancia, la alimentación de la madre se ha relacionado con cambios en la composición de la leche, especialmente sobre el perfil de ácidos grasos y micronutrientes (57). Dietas maternas durante el embarazo y/o la lactancia de restricción calórica y proteica, así como dietas hiperlipídicas y occidentales (ricas en grasas, azúcares sencillos y sal) se han asociado con una mayor predisposición a la obesidad de la descendencia por distintos mecanismos (58).

Se ha identificado que una restricción calórica provoca una menor producción de leche y con un contenido en lactosa disminuido, la restricción proteica se traduce en un menor contenido proteico de la leche, mientras que la dieta hiperlipídica da lugar a una producción mayor de leche y de su contenido en lípidos, así como el aumento de los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) en detrimento de los de cadena media (AGCM). Sin embargo, la correlación entre estas diferencias en la composición de la leche con el desarrollo de obesidad de la progenie queda aún por esclarecer y solo parece estar algo más estudiado en los casos de dietas hiperlipídicas u occidentales (58).

Uno de los mecanismos que podrían explicar la mayor adiposidad de la progenie de madres que siguen dietas occidentales durante la lactancia es la mayor facilidad de acumulación de los AGCL en comparación con los AGCM. Así mismo, este tipo de dietas por parte de las mujeres lactantes inducen hiperfagia y un cambio de las preferencias alimentarias por alimentos ricos en grasa, azúcares sencillos y sal en la descendencia que favorecen el desarrollo de obesidad (58).

En relación a la ingesta de carbohidratos, encontramos que dietas maternas de bajo índice glicémico se han asociado con mejoras metabólicas sobre la descendencia, mientras que una dieta rica en carbohidratos y baja en grasas ha demostrado el aumento de los niveles de AGCM en leche materna (59). Sin embargo, existe poca documentación para este componente de la dieta y no se conoce el efecto que pueda tener en distintas etapas del desarrollo ni según el tipo de carbohidrato ingerido (60).

En lo que respecta a los micronutrientes y fitoquímicos, restricciones de minerales, vitaminas u otras sustancias con potencial poder antioxidante (hierro, zinc, calcio, magnesio, cromo, cobre, selenio, ácido fólico, vitamina C, carotenoides, polifenoles, fitoesteroles, vitamina D y vitamina E) en la dieta materna durante etapas perinatales parecen suponer un perjuicio sobre la programación temprana de la obesidad debido al condicionamiento del sistema regulador del estrés oxidativo del organismo (61-70). Además, estos componentes de la dieta determinan parcialmente la concentración en leche materna y, en particular para el caso de las vitaminas A, B1, B2, B3, B6, B12, C, D y el yodo que tienen potenciales acciones epigenéticas, puede ser relevante una biodisponibilidad alterada. Por ejemplo, los folatos, la vitamina B12, la vitamina B6 y la betaína, son dadores de grupos metilo (69, 71, 72). Más específicamente, se han detectado niveles de folatos en sangre distintos en mujeres en edad fértil con sobrepeso en comparación con aquellas que tienen normopeso (73) y además se ha relacionado el estatus materno en folatos con el grado de metilación en el cordón umbilical de sus respectivos hijos/as (74). El grado de metilación del ADN también ha sido relacionado con la ingesta de AG Omega 3 durante el embarazo (75). La vitamina B6 también parece tener un papel en el mantenimiento del peso corporal (76) así como la vitamina A (70). Además, en general, la biodisponibilidad

durante la lactancia de los compuestos liposolubles depende en gran medida de las reservas y la ingesta materna de los mismos.

De hecho, la ingesta materna de Omega 3 en proporciones adecuadas a la de AG Omega 6 se ha relacionado con una menor adiposidad en la descendencia respecto de dietas más ricas en AG Omega 6 sobre los Omega 3, por lo que modular la proporción de estos tipos de ácidos grasos en la leche a través de la dieta materna constituye hoy día una práctica clínica extendida a través de estrategias puramente nutricionales (77, 78), a pesar de que se trata de un campo que presenta controversias en la literatura (79).

Por último, existe un grupo de nutrientes con funciones importantes sobre el desarrollo cerebral como son el hierro, el yodo, los ácidos grasos poliinsaturados y el zinc (80), por lo que su deficiencia podría estar ligada a las observaciones de falta de inervación neuronal a ciertas zonas de regulación de la ingesta (21). La ingesta de yodo materna debe asegurarse durante la lactancia para evitar un estatus deficiente, lo cual podría influir sobre la función tiroidea y el crecimiento infantil, por lo que se suele recurrir al uso de sal yodada o a su suplementación durante esta etapa (81, 82). Por lo que respecta al hierro y el zinc, ambos presentes en baja concentración en la leche, motivan que tras los seis meses de lactancia, las recomendaciones de alimentación infantil complementaria apuesten por la presencia de carnes y yema de huevo o cereales fortificados que aseguren el aporte de estos dos minerales (57).

El efecto global de una dieta con todos sus componentes nutritivos y no nutritivos sobre el conjunto de los componentes que tejen la estructura de la leche materna es en la actualidad una incógnita aún por despejar.

1.2.2 Consumo de suplementos

La suplementación con micronutrientes de las mujeres embarazadas es una práctica cada vez más común en la sociedad occidental. También durante la lactancia, muchas madres siguen con el mismo tipo de suplementos o se les recomienda la ingesta de otros considerados adecuados para la nueva situación fisiológica (83). Así mismo, los bebés suelen ser suplementados con vitamina D tras el nacimiento (84). Estas prácticas son habituales y, en general, se llevan a cabo sin la evaluación pertinente para el diagnóstico de una deficiencia, a excepción de los niveles de hemoglobina y hierro en la prevención de anemias (85).

Si bien es cierto que seguir una dieta occidental hipercalórica, rica en grasas y azúcares, suele conllevar una deficiencia en varios micronutrientes, la realidad es que el estatus nutricional de micronutrientes de las mujeres durante el embarazo y la lactancia no se evalúa rutinariamente y sus consecuencias sobre la salud materna y de la descendencia son aún bastante desconocidas (65). A día de hoy, tan solo la suplementación de la dieta materna con folatos y hierro durante el

embarazo y con yodo durante el embarazo y la lactancia tienen un respaldo unánime por parte de la OMS y otras organizaciones internacionales competentes (82, 86, 87). La suplementación con ácido fólico evita defectos del tubo neural mientras que el yodo previene alteraciones metabólicas asociadas con el desarrollo de la glándula tiroides. En cuanto al hierro, tan solo en casos de anemia durante el embarazo o como preparación al parto ante las pérdidas de sangre, es cuando su suplementación estaría justificada.

Algunas evidencias indican que la suplementación con micronutrientes durante el embarazo se asocia con una menor probabilidad de parir bebés con bajo peso al nacer (88). Por otra parte, deficiencias de hierro, calcio, magnesio y zinc se han propuesto como potenciales moduladores de la transmisión intergeneracional de la obesidad materna a la descendencia (88, 89). Si bien, en una revisión reciente sobre la nutrición materna durante la lactancia se concluye que hasta el momento no hay evidencia suficiente para suplementar la dieta materna con AGPI de cadena larga, vitamina D ni pre- y/o probióticos durante la lactancia para prevenir la obesidad en la descendencia (56).

Por ello, la evaluación de los efectos de deficiencias o excesos de micronutrientes y la suplementación recibida es importante en el estudio de la predisposición a la obesidad en la edad adulta y constituye un campo por explorar, especialmente durante la lactancia materna.

1.2.3 La composición de la leche materna

La composición de la leche materna es muy compleja y contiene una gran variedad de nutrientes y compuestos con actividad biológica que proceden tanto de la síntesis endógena en las células de la glándula mamaria, como de la contribución de los nutrientes almacenados en el organismo materno como el tejido adiposo o el hígado o de aporte de la dieta (57).

El componente mayoritario después del agua (86%) es la lactosa (7%), aunque también hay presentes un elevado número de otros hidratos de carbono como oligosacáridos y otros gluco-conjugados cuyas funcionalidades conocidas hasta la fecha resumimos recientemente en un capítulo de libro (90) y han sido ampliadas por distintos autores en los últimos años (59, 91-93).

La concentración de lactosa (6.2-7.2g/100mL) aumenta según avanza la lactancia, contrariamente a los oligosacáridos que disminuyen. La lactosa parece ser clave en la absorción del calcio de la leche y también en la producción de galactolípidos esenciales en el desarrollo del sistema nervioso central. Se trata de un nutriente específico de la leche cuyos niveles no varían a lo largo del día y no se ven afectados por un estatus nutricional materno deficiente (94).

Los oligosacáridos son el tercer componente mayoritario de la leche tras la lactosa y los triglicéridos. Se trata de un grupo de componentes de la leche humana cuya diversidad estructural y las cantidades en las que se encuentran son exclusivas de la leche materna, sin

embargo, su funcionalidad más allá de la nutricional está aún por explorar (94). De momento se les ha atribuido una importante relación en la modulación de la composición de la flora intestinal (95) y la protección frente a agentes patógenos a nivel del tracto gastrointestinal inmaduro del neonato (96), por lo que actualmente se está profundizando en este campo con el objetivo de mejorar la formulación de las leches artificiales y así promover el crecimiento de una flora intestinal beneficiosa en los bebés alimentados a base de fórmulas, ya que éstas no suelen contener la misma composición de oligosacáridos que la leche humana (97).

La fracción lipídica (4%) es el principal componente en relación a su aporte energético (98). Los triglicéridos son los lípidos más abundantes en la leche humana, seguidos por los fosfolípidos, los ácidos grasos que los componen (también presentes en forma libre) y los esteroides como el colesterol. Los lípidos se encuentran formando glóbulos de grasa, los fosfolípidos constituyen la capa externa mientras que los triglicéridos y esteroides se almacenan en su interior. La capa externa se conoce como membrana interfacial donde se pueden encontrar también proteínas, colesterol, enzimas, minerales traza y vitaminas liposolubles. Los glóbulos grasos además de las células presentes en la leche constituyen una emulsión en la fase acuosa estabilizada por la membrana lipídica interfacial y tienen un diámetro de 1 a 10µm, predominando los de menor tamaño.

Las funciones biológicas conocidas hasta la fecha de los lípidos de la leche materna son varias. En primer lugar aportan el 45-55% de las calorías por lo que es la principal fuente energética para el crecimiento y desarrollo del lactante. Además, los glóbulos de grasa son portadores de ácidos grasos esenciales como los poliinsaturados, los AG Omega 3 y Omega 6 de cadena larga, las vitaminas liposolubles (99) así como un conjunto de lípidos complejos característicos de la leche humana como la esfingomielina y otros fosfolípidos (100). Por último encontramos distintos ácidos grasos, colesterol y lípidos complejos con funciones muy diversas y con potenciales efectos sobre la salud de la descendencia (99).

La composición de la leche varía en función de las características maternas y de acuerdo a la etapa y duración de la lactancia, así como el momento del día. Mientras que la fracción proteica va disminuyendo según avanza la lactancia y no responde tan claramente a cambios dietéticos de la madre, la fracción grasa va en aumento según avanza la lactancia (101) y es la fracción más variable en respuesta a distintos factores como la duración de la gestación (102, 103), el número de partos previos (104), el volumen de leche secretada y especialmente en respuesta a los hábitos dietéticos maternos y su estatus nutricional (99).

Concretamente, el perfil en ácidos grasos refleja con bastante precisión su ingesta por parte de la madre lactante, especialmente en lo relacionado con los ácidos grasos esenciales (LA y ALA) y los poliinsaturados de cadena larga (AGPI) que incluye el balance entre los Omega 6 y los

Omega 3 así como los niveles del ácido docosahexaenoico (DHA) cuya importancia en el desarrollo está ampliamente descrita por la comunidad científica (105-108).

El cuarto constituyente sólido de la leche son las proteínas (1%) que se sintetizan en un 80-90% en los lactocitos (59). Las proteínas totales se pueden subdividir según su solubilidad en la fracción de micelas de caseína en suspensión (40%) y la de proteínas del suero en solución (60%) que incluye las lactoalbúminas y lactoglobulinas, inmunoglobulinas (IgA, IgG y IgM), lactoferrina, lisozima y otras glicoproteínas. Por último, las mucinas se encuentran incluidas en las membranas de los glóbulos grasos (59).

La leche también contiene una fracción minoritaria de nitrógeno no proteico que incluye la urea, creatina, creatinina, ácido úrico, pequeños péptidos y aminoácidos libres. Esta fracción supone 0.5g/L frente al 1.43g/L que supone el nitrógeno proteínico. Aunque la composición y funcionalidad del nitrógeno no proteico se ha investigado en menor medida en contraposición a la fracción proteica, ya se ha propuesto a esta fracción de la leche materna como un punto diferencial entre la leche humana y la artificial a igualdad de contenido proteico que podría tener funciones biológicas de interés distintas de las proteínas (94).

Entre las proteínas del suero mayoritarias encontramos la lactoferrina (1.7g/L), la IgA (1.0g/L) y la lisozima (0.5g/L) (109). La lactoferrina es una proteína capaz de captar dos moléculas de hierro por lo que actúa como inhibidora del crecimiento de bacterias dependientes de hierro a nivel gastrointestinal. Sus funciones inmunológicas así como su presencia elevada en comparación con la leche de vaca la hacen una proteína de gran interés durante la lactancia (96, 110). Además, la lactoferrina mejora la absorción intestinal del hierro y se ha propuesto como un factor de transcripción en células del epitelio intestinal promoviendo el crecimiento y la diferenciación celular (34). La IgA es la principal inmunoglobulina de la leche materna estando ausente en las leches de fórmula (59). Ésta provee protección y defensa frente a la infección de virus y bacterias que podrían invadir la mucosa inmadura del recién nacido, especialmente durante las primeras dos semanas de vida (111, 112). De forma similar, la lisozima tiene funciones de lisis, actuando como un factor antimicrobiano no específico y contribuyendo al desarrollo y mantenimiento de la flora intestinal del lactante (113, 114).

Por otro lado en las últimas décadas se han identificado un grupo de proteínas moduladoras con funciones sobre el crecimiento y regulación metabólica, así como sobre las redes neuronales durante la lactancia. Los factores de crecimiento, neuropéptidos y hormonas constituyen este grupo, además de las adipoquinas a las que se les ha asociado un potencial papel en la regulación metabólica y la impronta perinatal que determina el desarrollo de obesidad en la edad adulta (31, 35, 115-117).

Dentro de este grupo encontramos la leptina y la adiponectina principalmente, aunque en los últimos años también se han identificado otras hormonas con funciones asociadas a la regulación de la homeostasis energética como la grelina, resistina, obestatina, apelina y nesfatina (115).

La leptina es una adipocitoquina producida mayoritariamente por el tejido adiposo, presente en leche materna pero no en leche artificial y con un papel importante en la regulación del balance energético. Esta hormona actúa reduciendo la ingesta y promoviendo el gasto energético. Sus niveles en leche materna no son los más elevados de entre las adipoquinas, sin embargo, su correlación clara con la masa grasa corporal materna, su absorción en el tracto gastrointestinal inmaduro del neonato y su presencia en sangre de la descendencia, le confieren un papel clave en la regulación metabólica durante el desarrollo perinatal (118, 119).

De hecho, se ha demostrado que el aporte de leptina en dosis fisiológicas por vía oral durante la lactancia tiene un efecto protector frente al desarrollo de obesidad en la edad adulta en animales de experimentación (120), aunque en humanos la relación causa-efecto no ha sido establecida, no habiéndose realizado estudios de intervención..

Los mecanismos de acción a nivel del sistema nervioso central implican la modulación epigenética de la expresión de genes involucrados en la regulación metabólica a nivel hipotalámico (121), el desarrollo estructural y funcional del núcleo arcuato del hipotálamo (122), efectos periféricos que regulan la sensibilidad a la leptina y la insulina (123) y la modificación de la capacidad oxidativa del tejido adiposo, todo ello repercutiendo sobre la cantidad de comida ingerida por parte de la descendencia y la modulación de sus preferencias alimentarias (124-126).

En humanos, la leptina en leche materna se ha relacionado negativamente con el incremento de peso infantil hasta los 2 años, mientras que los lactantes alimentados con leches artificiales (deficientes en leptina) presentan mayor riesgo de desarrollar obesidad en edad adulta. Estos datos en su conjunto parecen indicar que esta adipoquina podría proteger moderadamente ante la acumulación de peso corporal en la descendencia (90) y constituye por tanto un campo actual de investigación por su potencial papel preventivo en el desarrollo de la obesidad en la edad adulta (127), y en nuestro grupo consideramos que puede haber factores en la propia leche materna que afecten a la funcionalidad de la leptina, especialmente en condiciones patológicas.

Así, las mujeres obesas presentan mayores concentraciones de leptina en leche (116) y la probabilidad de desarrollar obesidad de su descendencia sigue el mismo patrón (55, 65) independientemente de los niveles de leptina en leche materna (128), por lo que podría estar desarrollándose resistencia a la misma ya desde la lactancia e incluso durante el embarazo.

También es factible que las funciones y efectos sean distintos entre las condiciones de normopeso y sobrepeso u obesidad durante etapas perinatales, ya que se trata de estados de salud y enfermedad con múltiples diferencias metabólicas y funcionales.

De hecho, durante etapas tempranas del desarrollo la leptina parece no tener funciones anorexigénicas sino más bien aumentar el apetito y así promover la supervivencia, actuando pues como una señal previsor de futura escasez. Así, en lactantes con un crecimiento elevado se han identificados niveles también más elevados de leptina, así como cantidades totales ingeridas superiores en comparación con los que presentaron un crecimiento normal o bajo (117).

Por estas razones la leptina parece tener un papel relevante durante la lactancia tanto en la regulación de la ingesta como en el desarrollo y establecimiento de las redes neuronales implicadas en dicha regulación (118, 126, 129-133). Si bien, aún no existen datos conclusivos en cuanto a sus efectos sobre la composición corporal de la descendencia con resultados contradictorios en la literatura (31).

La adiponectina es la adipoquina más abundante en leche materna por encima de la leptina y la grelina. Los niveles de adiponectina sérica en el binomio madre-hijo/a correlacionan positivamente y la mucosa del tracto gastrointestinal presenta receptores para esta proteína, por lo que es muy posible que tenga un papel importante sobre el desarrollo y crecimiento infantil. Hasta la fecha, se le atribuye a esta hormona un papel regulador diferenciado según la etapa perinatal y asociado a unos niveles concretos, ya que a partir de los 15ng/mL la correlación de sus niveles frente al crecimiento infantil revierten. A su vez, los niveles dependen de la disponibilidad de alimento, con resultados claramente diferenciados en sociedades con escasez de alimentos de aquellas que viven en la abundancia de los mismos (31).

Además, la adiponectina sérica en individuos obesos presenta niveles inferiores y éstos se correlacionan a su vez con la resistencia a la insulina. Sin embargo, aún hacen falta estudios que evalúen la relación entre esta adipoquina y el desarrollo de obesidad en la descendencia, así como otros factores que puedan interactuar e influir en dicha relación (90).

Dentro de la fracción de nitrógeno no proteico de la leche materna encontramos los aminoácidos libres. Su caracterización no ha sido tan amplia como la existente para los ácidos grasos, aunque recientemente se está volviendo a prestar atención a estos componentes como potenciales moduladores de la impronta metabólica durante la lactancia por las diferencias frente a las leches artificiales (134).

Los niveles de aminoácidos libres totales son de dos a cinco veces mayores en leche humana que en leches artificiales (135) y la taurina, el ácido glutámico y la glutamina son los más

abundantes en leche madura a diferencia de la leche de vaca de la cual se suelen obtener todas las leches artificiales (136). Sin embargo, las concentraciones de citrulina, treonina, fenilalanina y tirosina son mayores en leches de fórmula en comparación con la leche materna.

Así mismo, el incremento en los niveles plasmáticos durante el embarazo de los aminoácidos arginina, glutamina, isoleucina, leucina, lisina, histidina, ornitina y citrulina los posicionan en el foco de atención por su posible papel crucial sobre el crecimiento y el desarrollo en esta etapa (137).

También encontramos que el ratio metionina/cisteína es muy superior en leches de otros mamíferos en comparación con la humana que sigue un perfil propio de los alimentos de origen vegetal (94). Recientemente, se han descrito diferencias significativas en el perfil de aminoácidos de la leche humana frente a la leche de vaca y de rata, lo que ha permitido proponer potenciales roles fisiológicos para los distintos aminoácidos que destacan en cada caso (138).

Así, se ha propuesto al glutamato y la taurina como los principales aminoácidos de interés durante etapas perinatales. El glutamato se ha relacionado recientemente con la regulación de la ingesta en la infancia (139) y la taurina participa en la absorción de la grasa además de tener un papel crucial sobre el crecimiento y desarrollo (137). Por todo ello, profundizar en la caracterización del perfil de aminoácidos en leche humana, así como analizar la influencia de la dieta y otros factores como el IMC materno o el sexo del lactante son de especial interés en la actualidad.

Finalmente, cabe abordar la composición en micronutrientes de la leche humana como son los minerales (0.8%) y las vitaminas (0.1%), aunque también se pueden encontrar otros compuestos bioactivos, microARNs y microorganismos o metabolitos procedentes de medicamentos, derivados de productos herbáceos y compuestos tóxicos como el alcohol o la nicotina en caso de consumirse por parte de la madre, que hemos revisado previamente en un capítulo de libro (90).

Los minerales pasan a formar parte de la leche por difusión pasiva o mediante bombas de transporte activo desde la sangre. Se encuentran en forma de iones o sales, en solución acuosa o formando parte de proteínas (metaloenzimas). Los mayoritarios son el sodio, el potasio, el calcio y el magnesio entre los cationes y el fosfato, cloro y citrato entre los aniones. También encontramos azufre, hierro, cobre, flúor, elementos traza como el selenio, zinc, yodo, cromo, cobalto, manganeso (140) y otros metales (141).

Las concentraciones de electrolitos y microelementos en leche materna parecen no verse influenciados por la dieta materna a excepción del yodo y el selenio (57); siguen una evolución

decreciente según avanza la lactancia a excepción del magnesio que no varía y algunos modifican sus niveles significativamente a lo largo del día como es el caso del hierro (94).

En general, los minerales en leche humana se encuentran también en leche de vaca pero en concentraciones de tres a seis veces inferiores, por lo que el soluto renal es considerablemente menor. Este hecho junto con la menor cantidad proporcional de proteínas se traduce en niveles de urea en orina más bajos en bebés que siguen lactancia materna exclusiva en comparación con aquellos alimentados a base de leches de fórmula (94).

Así mismo los ratios Na/K y Ca/P son de interés al ser tan diferentes entre leche materna y leche artificial y haberse relacionado con la hipertensión y la formación de hueso respectivamente (94).

Por otro lado, el hierro, el zinc y el selenio presentan una mayor biodisponibilidad en leche materna en comparación con las leches artificiales, por lo que junto con sus funciones en la regulación epigenética y del metabolismo, suponen un área de interés en el estudio de la impronta metabólica durante la lactancia (90).

Por su parte, las vitaminas reflejan más significativamente la ingesta materna, en especial en el caso de las liposolubles (A, D, E y K). Además la vitamina D se encuentra en niveles más bajos cuando la lactancia tiene lugar durante el invierno, en zonas de climas fríos y oscuros y también en etnias de piel oscura (94).

La tendencia generalizada de los niveles de vitaminas en leche materna es decreciente en su evolución desde el calostro hasta la formación de la leche madura al contrario de lo que le ocurren a las vitaminas hidrosolubles, en especial a las vitaminas B1 y B8. En relación con la leche de vaca, la leche materna presenta mayores concentraciones de vitaminas A y E así como de niacina (B3) y vitamina C (94).

Las vitaminas K y B2 presentan muy bajos niveles en el calostro durante los primeros días y responden ante la suplementación. Ambas se sintetizan primordialmente por parte de la flora intestinal y la primera se inyecta justo tras el parto para evitar problemas de coagulación (94).

Cabe destacar el papel que parecen tener un conjunto de vitaminas metabólicamente relacionadas por su relevancia en reacciones de metilación del ADN y modificación de histonas y por tanto de regulación sobre la expresión génica (69). Nos referimos a las vitaminas B2, B6, B8, B9, y B12 cuya relevancia como factores implicados en la regulación perinatal del metabolismo durante la lactancia aún se desconoce (142).

La leche materna humana también presenta microARNs, concretamente se han identificado alrededor de 1400 microARNs maduros distintos. El más abundante es el miR-148a-3p y a la

mayoría de los estudiados hasta la fecha se le han atribuido o propuesto funciones inmunomoduladoras (42).

Por último, en la leche materna también se pueden encontrar medicamentos, productos herbáceos, drogas, cosméticos, contaminantes ambientales y otros compuestos o sus metabolitos que pasan a la leche por exposición o por su acumulación en el organismo de la madre y que a día de hoy se sabe muy poco sobre sus posibles efectos sobre la programación temprana de la obesidad, a excepción de los llamados disruptores endocrinos (90).

1.3 Composición de la leche materna y crecimiento infantil

Los efectos de la composición de la leche materna sobre el crecimiento infantil responden al contenido nutricional, pero también a los componentes bioactivos cuyas funciones no son meramente nutricionales (143).

Mientras que la absorción de los nutrientes se asume fisiológica, otros componentes bioactivos pueden seguir procesos distintos que determinan sus efectos en el lugar de acción. Se han postulado diversos mecanismos por los cuales se cree que ciertos componentes bioactivos de la leche materna, incluso de naturaleza proteica, pueden alcanzar intactos el intestino de los bebés donde allí o tras su paso al torrente circulatorio ejercerían su cometido (109).

En resumen, el alto contenido de antitripsina, el hecho de tener un pH intestinal más alto en etapas tempranas y la inmadurez de la actividad enzimática pancreática contribuyen a evitar la proteólisis de componentes de naturaleza proteica. Además, existen receptores intestinales para componentes bioactivos específicos como para las adipoquinas (leptina, adiponectina, grelina). También encontramos vías alternativas de absorción de péptidos mediante difusión paracelular y por último, la leche contiene estructuras que transportan biomoléculas en su interior, como son los microARNs, que alcanzan la circulación infantil a través de los exosomas o las células lácteas (31).

Todo ello hace pensar en la leche como un alimento completo a nivel nutricional pero también como un sustrato que transporta información inteligente a la descendencia.

En lo que respecta al desarrollo de obesidad, en este apartado nos interesa identificar aquellos nutrientes y/o componentes de la leche materna que pudieran influir sobre las trayectorias de crecimiento infantil y el posible riesgo de obesidad en la edad adulta.

Hasta la fecha, el contenido proteico mayor de las leches artificiales es el componente más estudiado y más relacionado con el crecimiento infantil y en especial con la ganancia de peso

temprana que predispone a la obesidad futura (32, 144), sin embargo, si nos fijamos únicamente en la leche materna, no encontramos en la actualidad muchos estudios que propongan nutrientes o componentes con los efectos descritos previamente.

Recientemente, encontramos un estudio con 614 muestras de leche materna en el que se propone a la fracción grasa con un papel favorable sobre el peso y la adiposidad infantil mientras que los porcentajes de carbohidratos y proteínas tendrían el efecto contrario, esto último coincidiendo con los resultados obtenidos en las leches de fórmula (98).

También se ha relacionado en numerosas ocasiones los niveles de leptina y adiponectina en leche materna sobre el crecimiento infantil, sin embargo, los resultados obtenidos hasta la fecha son inconcluyentes (31, 131, 145-147), siendo más claros en el caso de leches procedentes de madres normopeso y probablemente, en la hipótesis que se maneja en nuestro laboratorio, otros factores intervienen en condiciones metabólicas alteradas.

Por último encontramos un conjunto de moléculas responsables de la activación del complejo diana de rapamicina en mamíferos (mTORC1) responsable del crecimiento y proliferación celular, la adipogénesis y la síntesis proteica. Se ha estipulado que una sobreactivación de este complejo de señalización podría traducirse en un incremento del peso corporal y del desarrollo de enfermedades crónicas, así como acelerar la llegada de la vejez (148).

Las moléculas que encontramos en la leche de vaca capaces de activar este sistema son los aminoácidos ramificados (especialmente la leucina), la glutamina, el triptófano y la arginina, los factores de crecimiento como la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), la glucosa, el ácido palmítico y algunos microARNs como el miR-21 (148).

En este sentido, el consumo de leche por parte de mujeres embarazadas con sobrepeso u obesidad seguido de una alimentación infantil a base de leches de fórmula altas en su contenido proteico ha demostrado tener un efecto sobre la programación de la obesidad infantil (148).

Sin embargo, el consumo de la leche materna durante la etapa de lactancia, fisiológicamente programada, constituye la fuente más completa y beneficiosa hasta el momento conocida para precisamente estimular y favorecer un crecimiento infantil adecuado.

Con estos datos, es interesante el estudio de la composición en aminoácidos ramificados y microARNs en leche, por su potencial efecto modulador del sistema mTORC1 a través del cual parece bastante probable que exista una de las vías de regulación de la programación metabólica en mamíferos y por tanto una diana terapéutica en la prevención temprana de la obesidad que podría ser potencialmente modulable a través de la dieta materna.

2. Hipótesis y Objetivos

Esta Tesis se enmarca en una de las principales líneas de investigación del grupo y se plantea tras la identificación de la leptina, una proteína presente en la leche materna pero no en las leches comerciales, que puede jugar un papel modulador del peso corporal. Nuestro grupo de investigación ha contribuido a la demostración del papel de la leptina en la etapa perinatal en la programación metabólica y su relevancia en el desarrollo de obesidad en edad adulta, especialmente en estudios en animales de experimentación (118, 123, 125, 126, 129). En su momento se planteó la conveniencia de obtener más datos, en las condiciones habituales de lactancia materna y en humanos, con la finalidad de obtener nuevos indicios que ayuden a la prevención de la obesidad.

La leche es un fluido de composición muy compleja, de modo que es factible que al igual que la leptina, otros ingredientes u otras pautas o factores en general también tengan un papel importante en el desarrollo de la red metabólica que confluye en la programación del balance energético del lactante. Nuevas metodologías a nuestro alcance, entre ellas las basadas en plataformas -ómicas, han posibilitado avances notables en la caracterización de la leche que han complementado la información disponible acerca de su composición y valor nutricional tradicionalmente aceptados. A pesar de ello, en la actualidad no se dispone de un conocimiento que permita entender la matriz láctea en toda su complejidad. Así pues, el análisis de determinados componentes de la leche puede permitir avanzar en el conocimiento de la complejidad de la matriz láctea y por tanto contribuir a la identificación de compuestos que también participen en la impronta metabólica a largo plazo que afecta al balance energético. Por otra parte, la composición de la leche puede considerarse dinámica, en el sentido de que puede adaptarse bastante al lactante, y que también depende de la dieta materna y posiblemente numerosos otros factores no totalmente elucidados.

Así pues, el planteamiento inicial de esta Tesis se ha centrado en abordar:

- 1) La caracterización e identificación de compuestos de potencial interés en leche materna en los primeros tres meses de lactancia y que podrían ser relevantes en el contexto de la programación temprana del neonato participando en la impronta metabólica a largo plazo del balance energético.
- 2) La caracterización de la dieta materna durante la lactancia, con el fin de analizar el impacto de factores dietarios sobre la composición de la leche y su potencial relación con la obesidad en el lactante.

La hipótesis es que un mejor conocimiento de estos elementos, así como de su interrelación, puede contribuir al conocimiento de factores que afectan la programación metabólica de la susceptibilidad a la obesidad durante la lactancia.

Para ello se han desarrollado los siguientes objetivos:

1. Reclutamiento y seguimiento de una cohorte de madres lactantes, de carácter observacional y longitudinal, representativas de la población lactante general y de sus bebés hasta los dos años de edad.
2. Análisis de compuestos de potencial interés en leche materna en los primeros tres meses de lactancia.
3. Análisis del patrón alimentario materno y valoración nutricional de la dieta seguida durante la lactancia.
4. Identificación de asociaciones que posibiliten la elaboración de esquemas de mediación, con sentido biológico, que se ajuste a la relación hallada entre determinados factores de la dieta materna durante la lactancia, la composición de la leche y su impacto sobre el desarrollo del bebé hasta los dos años de edad.

Se prevé que dichas aportaciones puedan contribuir a definir condiciones alimentarias para el crecimiento óptimo de los niños (incluso pensando en su edad adulta), a su optimización cuando no sea posible mediante lactancia materna y a aportar estrategias para su adecuación (por ejemplo, a través de la dieta de la madre lactante) en aquellos casos en los que la composición de la leche materna no sea la más idónea.

3. Metodología

3.1. Diseño y características del estudio Nutrigen-11

Se ha llevado a cabo un estudio de cohortes de madres lactantes, de carácter observacional y longitudinal para evaluar la influencia de la dieta materna sobre la composición de la leche y su potencial impacto sobre el crecimiento de la progenie hasta los 2 años de edad, con el objetivo de valorar su predisposición a desarrollar obesidad en la edad adulta.

El trabajo de campo se llevó a cabo entre los años 2011 y 2014. Se recogió información nutricional y muestras de leche materna de los tres primeros meses de lactancia y se recogió información sobre el desarrollo de los bebés hasta los 2 años de edad. El estudio (Nutrigen-11) se llevó a cabo de acuerdo con las directrices establecidas en la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de las Islas Baleares (IB1645/11 PI).

El contacto con las participantes y sus respectivos hijos se inició a través de la Asociación Balear de Promoción de Lactancia Materna con el apoyo institucional de la Dirección General de Salud Pública y de Atención Primaria de Mallorca a través de los centros de salud. Se eligieron tres centros de salud, representativos de tres núcleos poblacionales: s'Escorxador (Palma centro), Son Ferriol (Palma extrarradio) y Sa Torre (Manacor). En un primer encuentro, se presentó el proyecto a las matronas de cada centro de salud participantes para promover su implicación y colaboración. Posteriormente, se desarrollaron visitas periódicas a los distintos centros para incorporar voluntarias a la cohorte y efectuar su seguimiento.

Mayoritariamente, las participantes fueron reclutadas durante las sesiones de posparto en los centros de salud. Se incorporaron al estudio las voluntarias que cumplían los criterios de inclusión y que firmaban el consentimiento informado durante la primera entrevista. Todos los registros de este estudio se guardaron y manejaron de acuerdo a una codificación para mantener la confidencialidad de los datos de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal, y en su reglamento de desarrollo.

3.1.1 Recolección de información antropométrica y nutricional

Tras la incorporación formal de las voluntarias al estudio, en una primera entrevista se recogió información general acerca de las características antropométricas de la madre y del bebé, así como otros datos y/o observaciones que pudieran ser de interés. Por otra parte, se facilitó a las participantes el material que debería ser cumplimentado con la entrega de la primera muestra de leche, coincidiendo con los 30 días de lactancia. Para evaluar la dieta, se facilitó un esquema para efectuar un registro tipo recordatorio de 24 horas y un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos previamente validado en mujeres embarazadas que viven en España

(149). Las muestras de leche y los recordatorios de 24h se solicitaron de nuevo al 2º y 3er mes de lactancia.

Finalizada esta etapa de entrevistas personales, se mantuvieron contactos posteriores con las participantes para efectuar el seguimiento del crecimiento de los respectivos bebés, realizado por medio de una entrevista telefónica o por correo electrónico. Se contactaron a los 6, 12, 18 y 24 meses tras el parto y se les solicitó datos sobre el peso, la talla y el perímetro craneal de los hijos.

Todas las medidas antropométricas de los niños/as fueron tomadas por los pediatras encargados de su seguimiento y luego referidas por las madres a través de la consulta de la cartilla de nacimiento.

3.1.2 Recolección de las muestras de leche materna

Durante la primera reunión o en su caso en el primer contacto con la participante, se le informaba acerca de las condiciones de recogida y conservación de las muestras de leche que se acordaron recoger durante los tres primeros meses de lactancia (a los 30, 60 y 90 días de lactancia para cada participante).

Así se recomendó, que en su casa (poco antes de asistir a la cita) o en un entorno cómodo como la propia sesión posparto, recogieran una cantidad de leche (3-10mL) en un recipiente estéril suministrado previamente por el equipo investigador. En el centro de salud, se puso a disposición de cada voluntaria una copa recolectora de leche que se adapta suave y cómodamente al pecho y facilita la recogida de leche por goteo en el pecho que queda libre durante el amamantamiento del bebé, permitiendo una recolección natural y fisiológica del excedente de leche. Para aquellos casos en los que la extracción lo requería o si la madre lo prefería, se le suministraba un saca-leches manual para ayudar en la recogida. Las muestras fueron recogidas mayoritariamente durante las sesiones postparto mediante el sistema de copa recolectora, por lo que se trata de muestras de leche recogidas durante la toma. En algunos casos y coincidiendo con la recogida mediante saca-leches se llevó a cabo al inicio o al final de la toma, según decisión materna, así pues dando preferencia a que la madre considerase que la cesión de la muestra no afectaba negativamente la disponibilidad de alimento para su bebé.

Tras la extracción, se guardaban y transportaban las muestras en una nevera a 4°C hasta el laboratorio donde se disponían en alícuotas y almacenaban a -80°C hasta su posterior análisis. Todos los recipientes se etiquetaron con el código asignado a cada participante y el concerniente al periodo de la muestra, la fecha y hora aproximada de la extracción.

3.2 Seguimiento del crecimiento infantil de 0 a 2 años

Para evaluar el crecimiento infantil, es preciso seleccionar estándares adecuados con los que contrastar los datos antropométricos, ya que las referencias reflejan las características de la población a partir de la cual se han establecido y pueden condicionar la evaluación de la población objeto de estudio. Hasta el año 2006, los estándares utilizados variaban mucho de unos países a otros y la OMS trabajaba con unos estándares relativamente inadecuados, ya que se habían descrito a partir de poblaciones infantiles alimentadas con leches de fórmula en gran medida.

3.2.1 Los estándares para el crecimiento infantil de la OMS

Entre el año 2006 y 2009, la OMS publicó referencias actualizadas y que han sido posteriormente validadas, para el seguimiento del crecimiento infantil desde el nacimiento hasta los 5 años de edad en condiciones ambientales óptimas e independientemente de la etnia, el estatus socioeconómico y el tipo de alimentación que se siga (lactancia materna, mixta o de fórmula) (150-152).

Dichas referencias han sido extensamente implementadas en todo el mundo y han introducido importantes mejoras como la separación de los estándares por sexo, la introducción de nuevos indicadores antropométricos como el peso para la altura y el IMC para la edad, y el establecimiento de las referencias de acuerdo al potencial fisiológico de crecimiento en el estado de salud que el ser humano lleva a cabo bajo lactancia materna. Así pues, estas referencias establecieron como criterio primordial que la lactancia materna rige los patrones de crecimiento normales y que por tanto una alimentación alternativa se desviará de lo normal si difiere de estos estándares.

La forma de usar las curvas de crecimiento se puede basar en los percentiles o en la descripción de las puntuaciones z (z -scores), un estadístico que mide la relación de un dato en unidades de desviación estándar frente a la media poblacional de referencia. Así, un resultado de 0 significa que el dato no dista de la media poblacional a la cual se está comparando, mientras que valores de ± 2 suponen una diferencia de dos desviaciones estándar por arriba o por debajo de la media poblacional. Las revisiones que evalúan la implementación de las curvas de crecimiento infantil (153, 154), apuestan por trabajar con los z -scores, ya que permiten el seguimiento de individuos cuyos valores antropométricos se encuentran en los límites de los rangos que delimitan los percentiles, como ocurre en la desnutrición severa o la obesidad infantil.

En este estudio hemos trabajado los datos acerca del crecimiento de los bebés de 0 a 2 años mediante los z -scores calculados a partir del peso, la talla/altura y el perímetro craneal frente a los estándares de la OMS del 2006 mediante los macros adaptados para el paquete del programa

estadístico R que pueden descargarse directamente de la página de Internet de la OMS (<http://www.who.int/childgrowth/software/en/>).

A continuación se enumeran los indicadores propuestos por la OMS que hemos utilizado, así como su interpretación en la evaluación global del crecimiento infantil (155):

1. Longitud o estatura para la edad: la longitud se considera de 0 a 24 meses (<731 días) y la estatura a partir de entonces. Este indicador permite evaluar si un niño o niña es muy delgado ($z\text{-score} < -2$) o raquítrico ($z\text{-score} < -3$) debido a una desnutrición o enfermedad.
2. Peso para la edad: evalúa si un niño o niña tiene bajo peso ($z\text{-score} < -2$) o muy bajo peso ($z\text{-score} < -3$) a una edad concreta debido a una desnutrición o enfermedad. No permite evaluar el riesgo de sobrepeso ni obesidad. Debe considerarse la presencia de edema que podría enmascarar una desnutrición severa. Cuando esto ocurre se deben observar otros signos de marasmo o kwashiorkor.
3. Peso para la talla (de 45 a 110cm para la longitud de niños/as menores de 2 años): este dato ayuda a identificar niños/as en situación debilitante ($z\text{-score} < -2$) o de emaciación ($z\text{-score} < -3$) causada por una enfermedad reciente, un cese en la alimentación o su cronificación que se traduce en una pérdida aguda de peso corporal. Además también se puede identificar el riesgo de desarrollar sobrepeso ($z\text{-score} > 1$) o la presencia de sobrepeso ($z\text{-score} > 2$) u obesidad ($z\text{-score} > 3$).
4. Índice de masa corporal para la edad (IMC para la edad): es un indicador especialmente útil para examinar situaciones de riesgo de sobrepeso ($z\text{-score} > 1$), desarrollo de sobrepeso ($z\text{-score} > 2$) y de obesidad ($z\text{-score} > 3$). El IMC para la edad sigue un ritmo distinto del resto de indicadores con un aumento importante de 0 a 6 meses debido a un incremento de peso rápido en relación a la talla, seguido de una disminución de 6 a 24 meses y a partir de ahí se mantiene prácticamente constante hasta los 5 años de edad.
5. Perímetro cefálico para la edad: la circunferencia de la cabeza es un buen indicador de malnutrición proteica y sirve principalmente para la detección de alteraciones neurológicas. La interpretación de este parámetro puede indicar microcefalia o en su ausencia desnutrición moderada ($z\text{-score} < -2$) y macrocefalia, hidrocefalia o en su ausencia desnutrición severa ($z\text{-score} > 2$) (156).
6. Velocidad de crecimiento o ganancia de peso acumulada: la OMS presenta estándares ajustados a la edad y el sexo para el incremento de peso por intervalos de semanas o meses. En este estudio hemos calculado los $z\text{-scores}$ para el peso y a continuación en lugar de trabajar con las curvas de velocidad estándar de ganancia de peso se optó por adoptar el concepto de cambio de peso al comparar un punto final (6 meses) con el punto inicial que coincide con el nacimiento.

3.2.2 El peso al nacer

El género del recién nacido así como la dieta materna, composición corporal, altura y edad de las mujeres durante el embarazo juegan un papel crucial sobre el peso al nacer de los bebés. Los recién nacidos con un peso inferior a 2.5kg se consideran con bajo peso al nacer (157). Esto viene dado por un crecimiento fetal intrauterino restringido y/o una edad gestacional temprana entre otros factores. Además, si el peso al nacer es inferior al kilo y medio se considera muy bajo peso al nacer mientras que bebés con un peso al nacer superior a los 4 kilogramos se consideran macrosómicos.

Así pues, el peso al nacer ha sido utilizado en este estudio para evaluar si los lactantes nacieron con bajo peso o por el contrario fueron macrosómicos y estudiar la relación entre distintas variables maternas que pudieran estar asociadas con el peso al nacer.

Aparte del peso al nacer, existen otras clasificaciones en la evaluación de los patrones de crecimiento fetal que consideran la edad gestacional un factor determinante (158). Los recién nacidos se clasifican en pequeños (PEG) o grandes para su edad gestacional (GEG) dependiendo de las tablas o curvas de crecimiento utilizadas y también de los percentiles utilizados para delimitar dicha clasificación. Habitualmente, los percentiles 10 y 90 son los puntos de corte utilizados, pero también encontramos estudios que utilizan los percentiles 5 y 95. Además si un neonato tiene un peso para su edad gestacional inferior al estándar para el percentil 2.5, éste se considera muy pequeño para su edad gestacional (159, 160). En términos generales, los bebés se clasifican en pequeños, normales o grandes para su edad gestacional, según si se encuentran por debajo del percentil 10 en las curvas de crecimiento estándar, dentro del rango delimitado por los percentiles 10-90 o si superan el percentil 90, respectivamente para cada caso. En este estudio, hemos utilizado las curvas de crecimiento de Olsen *et al.* ya que dan resultados similares a las curvas de crecimiento para la edad gestacional españolas (161) y así permiten la comparación con otras poblaciones de estudios similares internacionales (162).

Finalmente, también existe una clasificación de los recién nacidos en base únicamente a su edad gestacional (163). De esta manera nacer entre las semanas 37 y 42 de la gestación se considera a término de acuerdo con la fisiología humana, mientras que una duración inferior del embarazo se clasifica como pre-término e igual o mayor a las 42 semanas se clasifica como post-término. Cabe mencionar que puesto que la edad gestacional puede variar según el método utilizado para estimarla: ultrasonidos o último periodo menstrual (164, 165), no tenemos total certeza de que los datos de edad gestacional ni las clasificaciones basadas en este parámetro sean exactos. En este estudio, hemos considerado la edad gestacional como una variable de confusión en la evaluación del crecimiento infantil.

3.2.3 El Índice de Masa Corporal y el Índice Ponderal

El IMC se calcula de la misma manera que en adultos, dividiendo el peso en kg por la talla en metros al cuadrado ($IMC = \text{Peso(kg)} / \text{Talla(m)}^2$). Se trata de un parámetro antropométrico muy utilizado en la evaluación del desarrollo infantil al ser un buen indicador de los niveles de masa grasa corporal. Tal y como ocurre en adultos, permite identificar situaciones de sobrepeso u obesidad entre la población infantil. Sin embargo su utilización difiere del uso para adultos ya que la edad y el sexo han de tenerse en cuenta. Además, el bajo peso se aborda con otro indicador diferente (peso para la edad). De esta manera, para evaluar el crecimiento infantil en base a esta variable, así como clasificar los niños y niñas en situación de sobrepeso u obesidad, se utiliza el cálculo de los z-scores relativos a unos estándares de referencia ajustados para la edad y el sexo (153). Este indicador también puede utilizarse en la identificación de problemas de exceso de peso a partir de los datos sin estandarizar y mediante el uso de las tablas que definen los puntos de corte a partir de los cuales se considera, para una edad determinada entre los 2 y los 18 años y para cada sexo, que el IMC equivale al $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$ o $IMC \geq 30 \text{kg/m}^2$, con sus respectivas interpretaciones, tal y como se usan en adultos (166).

Más recientemente, se ha empezado a utilizar otro indicador de la corpulencia y la adiposidad de los recién nacidos. Se trata del Índice Ponderal ($IP = \text{Peso(kg)} / \text{Talla(m)}^3$), un dato de conformación o volumen en el que la longitud toma más relevancia, dejando en segundo plano los cambios de peso más susceptibles a factores externos (167). Éste manifiesta el grado de delgadez o gordura de los recién nacidos reflejando el crecimiento hacia el final del embarazo, por lo que ha sido utilizado como indicador del estatus nutricional durante la última fase del embarazo.

El IP parece ser un buen indicador de la adiposidad en el recién nacido (168) por lo que en este estudio se ha calculado el IP para captar cambios asociados a la adiposidad que pudieran no manifestarse con otros parámetros o índices.

En la actualidad se disponen de estándares para el IP en neonatos que permiten evaluar el crecimiento fetal. El IP aumenta entre las 30 y las 37 semanas de gestación y luego se estabiliza. En casos de restricción del crecimiento fetal se produce una disminución del volumen de los tejidos adiposo y muscular, lo cual suele conllevar a una disminución del IP. Recientemente, se han propuesto unos valores de referencia entre los 168 días (6 meses aproximadamente) de gestación hasta los 297 días (casi los 10 meses) (167).

En este estudio utilizamos este indicador para evaluar cambios en la adiposidad desde el nacimiento hasta los 2 años de edad y plantear posibles diferencias e interpretaciones respecto del IMC si las hubiera.

3.2.4 La velocidad de crecimiento

El crecimiento infantil sigue un progreso rápido a la vez que desacelerado desde el nacimiento hasta el primer año de vida donde alcanza una estabilización y disminuye ligeramente a continuación hasta alcanzar los dos años de edad. Este patrón se presenta cuando las condiciones de nutrición y factores psicosociales son adecuadas y no ha habido infecciones crónicas o agudas de alta severidad. En definitiva, si el entorno es favorable y óptimo, un recién nacido dobla su peso hacia los 6 meses y lo triplica hacia el primer año de vida.

Sin embargo, patrones irregulares o alternados de aumentos y reducciones en la velocidad de crecimiento pueden darse sin ser por ello un signo de morbilidad. En relación con el peso corporal por ejemplo, pérdidas durante un periodo de tiempo determinado suelen verse recompensadas con velocidades mayores de recuperación del peso perdido. Además hacia los seis meses de edad se suelen dar incrementos negativos del peso corporal debido al destete y al aumento de la actividad corporal (169, 170).

Sin embargo, en los últimos años ha tomado especial relevancia este indicador en relación al estudio de la programación temprana de la obesidad debido a que un incremento de peso rápido durante la infancia se ha asociado con la prevalencia de la obesidad en la edad adulta a pesar de que su definición aún debe estandarizarse (171, 9). Por ello, en este estudio se ha trabajado con este concepto para obtener una variable que resumiera la velocidad de la ganancia de peso corporal de la descendencia y poder así evaluar las asociaciones entre variables maternas y de la composición de la leche materna con el ritmo de crecimiento infantil.

Hasta el momento, la definición del concepto de incremento de peso rápido utilizada consiste en una diferencia superior a $+0.67\text{DE}$ (desviaciones estándar) entre dos edades diferentes para los z-scores calculados para el peso para la edad ajustado por sexo. En general, las dos edades elegidas para evaluar la predisposición futura a la obesidad y utilizadas también en este estudio han sido el nacimiento y los 6 meses ya que con mayor frecuencia se ha descrito un crecimiento post-natal rápido como factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades metabólicas en la edad adulta.

3.3 Valoración nutricional

La valoración nutricional de la ingesta materna se evaluó mediante la implementación de tres recordatorios de 24 horas (R24h) y un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) previamente validado (149) y que se adaptó a los hábitos alimentarios específicos de la población estudiada.

Cada R24h se hizo coincidir con la recogida de la muestra biológica que tuvo lugar durante los primeros tres meses de lactancia materna tras el nacimiento. En aquellos casos en los que la madre no atendió todas las citas, solo disponemos de una (n=2) o dos (n=5) muestras de leche materna y sus respectivos R24h.

El CFCA permitió el registro de la ingesta habitual de 64 alimentos o conjuntos de alimentos. Éstos fueron clasificados en grupos en base a su similitud en cuanto a la composición en nutrientes. La composición nutricional para estos grupos se revisó y actualizó utilizando la base de datos de composición de alimentos americana versión 26 (<http://ndb.nal.usda.gov/>) y la española (<http://www.bedca.net/>). La frecuencia de consumo de alimentos se basó en el número de veces que cada ítem se ingería por semana o mes.

A partir de los datos individuales de consumo de alimentos derivados de ambos tipos de cuestionarios se calcularon las ingestas de nutrientes. La transformación de los alimentos a nutrientes en el caso del R24h se llevó a cabo mediante el uso del software DIAL (172). Se trata de un programa de uso general y profesional para valoración de dietas y cálculos de alimentación, que trabaja en entorno Windows y contiene una tabla de alimentos y platos que aportan su composición nutricional. Para una correcta valoración, también se tuvieron en cuenta las respuestas en relación con el consumo de suplementos alimentarios, adición de sal a las comidas y tipo de grasa utilizada mayoritariamente durante el cocinado.

Así se obtuvieron las ingestas de los macronutrientes (lípidos, hidratos de carbono y proteínas), incluyendo la fibra y sus diferentes tipos, azúcares, agua, alcohol, lípidos totales y tipos de ácidos grasos, así como el total de la energía y el colesterol. Los valores obtenidos se procesaron en unidades de ingesta (gramos, miligramos o microgramos), así como el porcentaje relativo al valor energético total para los macronutrientes. Los porcentajes se calcularon mediante la conversión de gramos a calorías diarias ingeridas a partir de las conversiones para las grasas (9 kcal/g) y las proteínas (4 kcal/g) y restando su aporte al 100% para obtener el porcentaje debido a los carbohidratos que incluye el debido a la fibra (2 kcal/g), los ácidos orgánicos (3 kcal/g) y al alcohol en caso de haberse consumido en la dieta (7kcal/g).

También se obtuvieron las estimaciones acerca de la ingesta de micronutrientes, incluyendo minerales (calcio, hierro, magnesio, zinc, sodio, potasio, fósforo, selenio, cobre, cloro,

manganeso, iodo, flúor, aluminio, cromo, bromo y níquel) y vitaminas (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12, A, D, E, K y C). Además, el software utilizado nos dio algunas aproximaciones para la ingesta de componentes de los alimentos como algunos ácidos orgánicos, fitosteroles, quercetina, cafeína y teobromina, bases nitrogenadas, el ácido fítico y la fosfatidilcolina.

En el caso de la transformación de los alimentos a nutrientes a partir del CFCA se llevó a cabo mediante una plantilla de intercambios basada en las tablas de composición de alimentos francesa (REGAL) de acuerdo con el procedimiento seguido en la validación del CFCA y que fue facilitada por los autores de la publicación (149). Así, se obtuvieron resultados para un grupo de nutrientes, inferior en número en comparación con el R24h, pero que fue suficiente para poder validar la valoración de la ingesta de nutrientes en la población estudiada.

La validación se hizo mediante una comparación en base a los coeficientes de correlación de Pearson y un análisis de Bland-Altman (173), además del porcentaje de concordancia en la clasificación por quintiles y el estadístico kappa (174, 175). Para aquellas variables que presentaban asimetría estadística en su distribución, se llevó a cabo el análisis mediante los coeficientes de correlación de Spearman, obteniendo unos resultados muy similares a los obtenidos mediante las pruebas paramétricas.

También se trabajó el análisis de Bland-Altman con los resultados para la ingesta de nutrientes ajustados al total de la ingesta energética. Dicho ajuste se realizó mediante el método de los residuos de la siguiente manera (176): se planteó un análisis de regresión lineal para cada nutriente, siendo éste la variable dependiente y la ingesta energética total la variable independiente. La ecuación resultante se usó para calcular la ingesta promedio esperada para dicho nutriente del total de la población estudiada en referencia al promedio de la ingesta energética total. A continuación, se calculó la ingesta ajustada al aporte calórico para cada individuo mediante la suma de la ingesta promedio esperada de cada nutriente sobre el valor residual derivado del análisis de regresión.

Así mismo, las ingestas de nutrientes estimadas mediante ambos tipos de cuestionarios fueron clasificadas en quintiles. De esta manera pudimos calcular la proporción de individuos clasificados en el mismo grupo/quintil o en quintiles adyacentes que consideramos como el porcentaje de concordancia entre los resultados del CFCA y el promedio de los R24h. Además, el grado de concordancia entre ambas clasificaciones también se comparó mediante el estadístico kappa (177).

La validación del registro dietético se llevó a cabo para un total de 30 nutrientes que incluyeron la ingesta energética y el agua. Los datos crudos se transformaron a una escala logarítmica para

mejorar la normalidad y mejorar la correlación entre las variables obtenidas a partir del CFCA frente a las procedentes del R24h. La estimación de la ingesta resultó muy similar entre ambos cuestionarios (Tabla 3.1).

Nutrientes	R24h		CFCA		Correlación de Pearson		Análisis de Bland-Altman			Clasificación por quintiles	Correlación de Kappa	
	Media	DE	Media	DE	Coefficiente	p	CFCAlog-R24hlog	LdC (intervalos de confianza 95%)	Amplitud LdC	% concordancia	Coefficiente k	
Energía (kcal)	2152.8	537.6	1932.0	463.0	0.32	0.01	0.10	-0.45	0.66	1.10	71.19	0.37
Agua (g)	2614.9	846.7	2530.9	725.4	0.50	0.00	0.02	-0.59	0.64	1.23	88.14	0.62
Proteínas (g)	86.2	18.6	72.3	20.3	0.45	0.00	0.19	-0.33	0.72	1.05	66.10	0.41
Carbohidratos (g)	203.7	59.1	204.6	54.4	0.23	0.08	-0.01	-0.69	0.66	1.35	59.32	0.22
Azúcares (g)	87.9	30.3	98.2	32.1	0.49	0.00	-0.12	-0.80	0.56	1.36	74.58	0.51
Almidón (g)	110.8	43.2	81.6	26.0	0.13	0.31	0.29	-0.63	1.20	1.83	57.63	0.18
Fibra total (g)	12.5	4.8	18.6	6.7	0.20	0.13	-0.42	-1.35	0.50	1.85	55.93	0.13
Lípidos (g)	106.0	34.1	90.9	23.8	0.26	0.04	0.14	-0.56	0.83	1.38	66.10	0.33
AGS (g)	33.3	11.6	24.4	7.3	0.44	0.00	0.29	-0.41	1.00	1.41	74.58	0.42
AGMI (g)	48.0	17.7	48.1	13.1	0.10	0.47	-0.03	-0.85	0.79	1.64	50.85	0.12
AGPI (g)	15.8	6.3	11.1	2.8	0.26	0.05	0.31	-0.48	1.10	1.57	66.10	0.33
Colesterol (mg)	342.2	119.7	252.8	82.7	0.29	0.02	0.29	-0.56	1.14	1.70	62.71	0.25
Sodio (mg)	2253.7	702.2	3423.7	948.7	0.32	0.01	-0.43	-1.12	0.26	1.37	64.41	0.29
Magnesio (mg)	294.1	85.2	270.0	78.8	0.45	0.00	0.09	-0.48	0.65	1.13	69.49	0.36
Fósforo (mg)	1418.8	350.5	1123.2	311.6	0.42	0.00	0.24	-0.31	0.78	1.09	66.10	0.40
Potasio (mg)	3058.9	765.2	3216.9	999.5	0.48	0.00	-0.04	-0.57	0.49	1.06	69.49	0.40
Calcio (mg)	875.6	301.6	897.9	293.5	0.43	0.00	-0.04	-0.74	0.67	1.40	74.58	0.45
Hierro (mg)	13.8	4.4	9.8	3.0	0.34	0.01	0.34	-0.33	1.01	1.35	61.02	0.36
Retinoides (µg)	410.5	238.4	295.1	125.6	0.37	0.00	0.25	-1.00	1.49	2.50	59.32	0.26
Betacarotenos (µg)	3695.5	2038.9	6951.0	4188.9	0.35	0.01	-0.70	-2.17	0.78	2.95	59.32	0.23
Vitamina D (µg)	3.1	2.9	2.5	1.7	0.24	0.07	0.25	-2.06	2.57	4.63	59.32	0.23
Vitamina E (mg)	10.1	3.8	10.9	2.8	0.25	0.06	-0.11	-0.86	0.64	1.51	66.10	0.36
Vitamina C (mg)	130.2	61.4	115.9	42.1	0.71	0.00	0.07	-0.62	0.77	1.39	88.14	0.72
Tiamine B1 (mg)	1.4	0.4	1.4	0.4	0.44	0.00	0.01	-0.60	0.62	1.22	72.88	0.36
Riboflavina B2 (mg)	1.9	0.6	1.7	0.5	0.43	0.00	0.10	-0.55	0.75	1.30	71.19	0.41
Niacina B3 (mg)	19.0	5.6	18.8	5.9	0.43	0.00	0.02	-0.62	0.66	1.28	67.80	0.37
Ácido pantoténico (mg)	5.4	1.4	3.6	1.0	0.17	0.21	0.42	-0.28	1.13	1.42	61.02	0.23
Vitamina B6 (g)	2.2	0.7	2.0	0.6	0.58	0.00	0.11	-0.43	0.66	1.09	72.88	0.52

Nutrientes	R24h		CFCA		Correlación de Pearson		Análisis de Bland-Altman			Clasificación por quintiles	Correlación de Kappa	
	Media	DE	Media	DE	Coefficiente	p	CFCAlog-R24hlog	LdC (intervalos de confianza 95%)	Amplitud LdC	% concordancia	Coefficiente k	
Vitamina B12 (µg)	5.5	2.8	5.0	1.8	0.17	0.19	0.05	-1.01	1.11	2.13	55.93	0.18
Ácido fólico (µg)	279.7	107.2	390.4	156.4	0.52	0.00	-0.33	-1.05	0.38	1.43	71.19	0.48

Tabla 3.1 Resultados de la validación de la estimación de la ingesta de alimentos. R24h, recordatorio de 24 horas; CFCA, cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos; DE, desviación estándar de la media; LdC, Límite de Confianza; CFCAlog, logaritmo neperiano de los resultados de ingesta de nutrientes determinados mediante el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos; R24hlog, logaritmo neperiano de los resultados de ingesta de nutrientes determinados mediante el promedio de los recordatorios de 24 horas registrados. Para más detalle leer el texto explicativo inmediatamente posterior.

Esta tabla muestra la media y desviación estándar de la ingesta de macronutrientes y micronutrientes según el CFCA y el R24h para la muestra poblacional. A continuación se muestran los resultados del análisis de correlaciones de Pearson, el análisis de Bland-Altman, el grado de concordancia de acuerdo a la clasificación por quintiles y el estadístico kappa. Los datos de ingesta de nutrientes fueron previamente transformados a la escala logarítmica para los análisis de validación de Pearson y Bland-Altman. CFCAlog-R24hlog es la diferencia promedio entre las medidas para un determinado nutriente procedentes del CFCA y del R24h respectivamente. La amplitud para los límites de coincidencia resulta de la diferencia entre el límite superior y el inferior y representa el grado de acuerdo entre las medidas. A mayor amplitud menor coincidencia y alrevés.

De entre los macronutrientes, las ingestas de almidón, fibra total y colesterol presentaron amplitudes mayores, por lo que existe mayor variabilidad para estos resultados al analizarlos con las distintas metodologías de encuesta alimentaria. Sin embargo, del análisis de correlación de Pearson entendemos que la ingesta de colesterol es significativa entre ambos métodos y que las de almidón y fibra total mantienen su desacuerdo, pero además se suma la ingesta de AGMI y también de carbohidratos totales. La clasificación por quintiles y el estadístico kappa reforzaron estos resultados.

En el caso de los micronutrientes, las vitaminas obtuvieron menores puntuaciones en promedio que los minerales (0.38 frente a 0.40), encontrando los coeficientes de Pearson más bajos para las vitaminas B5 y B12, D y E, todos ellos no significativos. Sin embargo también entre las vitaminas encontramos los coeficientes de Pearson más altos para las vitaminas C, B6 y B9. Además la clasificación por quintiles y el estadístico de kappa mostraron que las vitaminas E y B5 coincidieron entre ambas encuestas a pesar de que dicha correlación no sea lineal.

Los coeficientes de correlación de Pearson fueron desde 0.1 para la ingesta de AGMI hasta 0.71 para la de vitamina C. El coeficiente promedio para la ingesta de todos los nutrientes fue de 0.36. Este resultado es similar al descrito previamente para una población de mujeres postparto aunque los nutrientes estudiados y los cálculos usados para la valoración de la ingesta fueron distintos (175). La gran mayoría de los nutrientes obtuvieron coeficientes de correlación significativos a excepción de los hidratos de carbono, la fibra total, el almidón y los AGMI entre los macronutrientes y el ácido pantoténico, las vitaminas D, E y B12 entre los micronutrientes.

Del análisis de Bland-Altman observamos que todas las diferencias entre las medias resultaron positivas exceptuando los carbohidratos, azúcares, fibra total, AGMI, sodio, potasio, calcio, betacarotenos, vitamina E y ácido fólico que obtuvieron cifras más altas a través del registro

mediante el CFCA. Los límites de coincidencia más alto y más bajo representan el rango en el cual el 95% de las diferencias entre ambas metodologías se esperaban encontrar. Los rangos más amplios se observaron para el almidón, la ingesta de fibra total y el colesterol entre los macronutrientes y los retinoides, betacarotenos, vitamina D y vitamina B12 entre los micronutrientes. Esta observación hace referencia a que estos nutrientes presentaron mayor variabilidad en su estimación de la ingesta, ya sea por el tipo de alimentos que contribuyen a la misma o la disponibilidad de datos en las tablas de composición de alimentos utilizadas.

Nuestros resultados de porcentajes de concordancia derivados de la clasificación por quintiles se situaron entre el 50.85% para los AGMI hasta el 88.14% para la ingesta de agua y vitamina C. En otros estudios los rangos son más estrechos cuando se estudia la reproducibilidad entre CFCA repetidos, más altos si se considera únicamente la clasificación en el mismo quintil en lugar de tener también en cuenta los adyacentes, tal y como es nuestro caso y obtienen algunas mejoras ligeras si ajustan la ingesta por la energía (175, 178).

En cualquier caso, los resultados son similares a pesar de partir de un número distinto de individuos, utilizar distintas metodologías de referencia o trabajar con poblaciones de distintas características (177, 179). De hecho, nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos recientemente en un estudio en el que los autores concluyen haber obtenido un nivel de concordancia satisfactorio al obtener una media de 0.36 para el análisis de correlaciones de Pearson (179) y en definitiva, las ingestas estimadas mediante ambos cuestionarios presentaron una correlación aceptable.

Los resultados de esta validación junto con razones metodológicas nos llevaron a tomar la decisión de trabajar con los resultados para la ingesta estimada a partir del promedio de los tres R24h registrados. Esta motivación fue reforzada por la posibilidad de estimar la ingesta de 149 nutrientes frente a los 43 posibles mediante el CFCA, además de que el R24h es una metodología de referencia (180, 181).

La valoración de la ingesta se llevó a cabo en comparación con las Ingestas Recomendadas y los Objetivos Nutricionales para la población española actualizados en 2013 (182), teniendo en consideración los valores de referencia disponibles de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, <http://www.efsa.europa.eu/en/publications.htm?text=dietary+reference+values>) y los del Instituto de Medicina Americano (IoM, http://www.iom.edu/Global/Search.aspx?q=RDA&output=xml_no_dtd&client=iom_frontend&site=iom&proxyreload=1) a 31 de Mayo de 2014. Para la evaluación de la ingesta de

micronutrientes se tuvo en consideración los requerimientos nutricionales durante la lactancia y los valores de referencia en Europa revisados recientemente por la red para el estudio de la estandarización en las recomendaciones de micronutrientes EURRECA (183).

Así mismo, las ingestas dietéticas se compararon con los resultados de la encuesta nacional de ingesta dietética (ENIDE) de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) (184, 185) y con una actualización del 2013 sobre las tendencias de consumo alimentario de la población española entre los años 2000 y 2012 (186).

Además, se evaluó la adherencia a la dieta mediterránea mediante el uso de la puntuación desarrollada por Trichopoulou *et al.* (187, 188). Ésta se basa en el consumo de ocho elementos relacionados con el patrón de dieta mediterránea (*Mediterranean Diet Score 1*, MDS1): verduras, legumbres, frutas, productos lácteos, cereales, productos cárnicos, el alcohol y la proporción de grasas AGM/AGS. Si además se incluye el consumo de pescado propio de zonas costeras como es la cuenca mediterránea, entonces el índice de adherencia a la dieta mediterránea pasa a tener nueve elementos en su evaluación (*Mediterranean Diet Score 2*, MDS2). En ambos casos, el consumo de los componentes beneficiosos por encima de la mediana poblacional, como es el caso de una relación alta de ácidos grasos monoinsaturados frente a los saturados, recibe 1 punto, mientras que si el consumo del individuo no alcanza la mediana no se puntúa. Por el contrario, el consumo de los componentes que se presumen perjudiciales si se consumen en exceso, como los productos lácteos y cárnicos, se puntúan al revés, recibiendo 1 punto en caso de que el consumo del individuo sea inferior a la mediana poblacional y ninguno si lo supera. Debido a que la ingesta de etanol durante la lactancia está contraindicada (189), las madres que reportaron consumo de bebidas alcohólicas recibieron 0 puntos, mientras que el consumo nulo se puntuó con 1 punto, contrariamente a lo que se estipula para la población general. De esta manera, el resultado para los índices MDS1 y MDS2 fue de 0 (mínima adherencia a la dieta mediterránea tradicional) a 8 o 9 respectivamente (adherencia máxima).

3.4 Análisis de componentes de interés en leche materna

Cada una de las alícuotas previamente preparadas de cada una de las muestras de leche materna recogidas para cada uno de los meses ensayados y las mujeres lactantes del estudio se descongelaron en hielo, se homogeneizaron con vortex durante unos segundos y se tomó la cantidad requerida para cada uno de los análisis pertinentes mediante el uso de una pipeta automática calibrada asegurando la determinación de los distintos componentes en la leche entera.

Para la preparación específica de la muestra previamente a los distintos análisis se siguieron los pasos recomendados por los fabricantes de los kits comerciales en su caso o se especifican en el apartado correspondiente si es distinto del descrito previamente. Para los análisis que fueron externalizados las muestras se enviaron congeladas a -80°C en hielo seco y mediante correo certificado urgente especializado.

3.4.1 Triglicéridos y ácidos grasos

Los triglicéridos (TGs) y ácidos grasos no esterificados (NEFAs) se determinaron mediante kits disponibles comercialmente. En el ensayo de los TGs (BIOVISION K622-100), éstos se convierten en ácidos grasos libres y glicerol mediante reacción enzimática. El glicerol se oxida a continuación y genera un producto que, en reacción estequiométrica, absorbe a 570nm. En el ensayo de los NEFAs se utilizó el kit NEFA-HR (2) de Wako que es un método enzimático basado en la acilación de la coenzima A (CoA) por los ácidos grasos en presencia de sintasa añadida. El producto final de la reacción enzimática forma un producto de color púrpura que se puede valorar por espectrofotometría a 550nm.

La determinación del perfil completo de ácidos grasos individuales en las muestras se hizo por duplicado mediante cromatografía de gases. Para ello se usó un método previamente descrito (190, 191), ajustado para trabajar con una cantidad reducida de muestra (unos $10\mu\text{L}$ (192)). Los extractos de hexano finales que contienen ácidos grasos metilados se transfirieron a un vial de inyección automático para su análisis por cromatografía de gases en un sistema HP-7890A Serie GC (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector de ionización de llama, un inyector automático y un software de Hewlett-Packard ChemStation. La separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos se llevó a cabo en una columna capilar de sílice fundida Rtx-2330 (40m x 0,18mm de diámetro, ID. $0,10\mu\text{m}$) revestida con fase estacionaria de (90% polibiscianopropilo-10% cianopropilphenilo) siloxano de Thames Restek (Saunderton, Reino Unido).

Los picos cromatográficos de la muestra se identificaron por comparación con los tiempos de retención de los ésteres metílicos de ácidos grasos de mezclas estándar (Supelco 37 Component

FAME Mix Catalog No. 47885-U, PUFA-1, Marine Source Catalog No. 47033, PUFA-2, Animal Source Catalog No. 47015-U, PUFA-3, Menhaden Oil Catalog No. 47085-U y FAME Mix GLC-100 Catalog No. 1899-1AMP). La cuantificación se hizo por normalización interna mediante la adición del ácido graso C13:0 como patrón interno y los resultados se expresaron en cantidades relativas, como porcentajes del total de ácidos grasos detectados e identificados en cada muestra. Las áreas correspondientes a los ácidos grasos individuales se relacionaron con el área del patrón interno en la muestra. La suma de dichas áreas relativas se tomó como el 100 % de los ácidos grasos detectados y se calculó el porcentaje que cada ácido graso individual representaba del total determinado.

Se ha considerado los ácidos grasos de cadena media (AGCM) como la suma de los AG C8:0, C10:0, C12:0 y C14:0; los saturados totales (AGS) como la suma de los AGCM además del C16:0, C17:0, C18:0, C19:0, C20:0, C21:0, C22:0, C23:0 y el C24:0. Los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) agruparon al C14:1n5, C15:1n5, C16:1n9, C16:1n7, C17:1, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9 y C22:1n11 mientras que los poliinsaturados (AGPI) incluyeron al C16:2n4, C18:2n6c, C18:3n6, C18:3n3, C18:4n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:4n3, C20:5n3, C22:5n3 y el C22:6n3. Finalmente los ácidos grasos *trans* totales (TRANS) incluyen el C18:1n11t, C18:1n9t y C18:2n6t.

3.4.2 Proteínas de interés y aminoácidos

El contenido de proteína total en las muestras de leche se determinó por el ensayo de Bradford (193) usando un patrón de albúmina de suero bovino.

La concentración de leptina en las muestras se determinó mediante un kit comercial (Quantikine DLP00) basado en una reacción de inmuno-absorción ligada a enzimas (ELISA). Siguiendo el protocolo del fabricante y previamente validado en nuestro laboratorio (131).

La concentración de adiponectina en la leche entera (194) se determinó por un kit de ELISA de alta sensibilidad (Abnova) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

También se caracterizaron los siguientes factores inmunológicos: lactoferrina, lisozima e inmunoglobulina A (IgA). Las concentraciones de dichas proteínas se determinaron siguiendo con las recomendaciones de los fabricantes de los kits comerciales utilizados, basados en un ensayo ELISA (Bethyl Laboratories TX E88-143, ELISA kit Abnova lisozima humana ab108877 y Bethyl laboratorios cat. No. E88-102e, respectivamente). Los cálculos se realizaron usando el software Graph-Pad Prism (GraphPad, ver. 3.0, San Diego, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante en cada caso. Las determinaciones de estas proteínas relacionadas con la inmunidad solo se efectuaron con muestras de 1 mes, por limitación en la cantidad de muestra disponible.

Los niveles de aminoácidos libres en leche fueron determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid. Los resultados se calcularon en unidades de concentración molar (pMol/ μ L) para los siguientes aminoácidos: alanina, glicina, aspartato, glutamato, glutamina, taurina, prolina, asparagina y serina entre los no esenciales (AaNE); la arginina, tirosina y cisteína entre los semi-esenciales (AaSE); la histidina, treonina, valina, metionina, triptófano, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina entre los aminoácidos esenciales (AaE).

Los resultados se presentaron para todos los aminoácidos individuales, las agrupaciones de acuerdo a su dependencia de la dieta previamente descritas así como otras características bioquímicas. Así, dispusimos los aminoácidos largos de cadena neutra (AaLN) que incluyeron el triptófano, tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina y valina; los ramificados (AaR) la isoleucina, leucina y valina y por último los sulfurados (AaS) la taurina, cisteína y metionina.

3.4.3 Minerales

Los minerales fueron determinados cuantitativamente mediante espectrometría de emisión óptica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo ICP-OES.725-ES en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid.

La preparación de las muestras de leche materna previamente al análisis consistió en una digestión con ácido nítrico en horno microondas en vaso cerrado a presión.

Los resultados para los minerales calcio, fósforo, azufre, magnesio, sodio y potasio se expresan en unidades de concentración (mg/100ml).

3.4.4 Precursores de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)

Los precursores de NAD (nicotinamida, ácido nicotínico, nicotinamida ribósido y nicotinamida mononucleótido) fueron determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución en el Servicio de Recursos Científicos y Técnicos de la Universidad Rovira i Virgili en Reus conocido como el “Centre for Omic Sciences” (COS).

La preparación de las muestras de leche consistió en añadir 20 μ L de estándar interno, 1000ppb (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA y Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) a 20 μ L de muestra. A continuación se realizó una precipitación de las proteínas mediante la adición de 40 μ L de NH₄AcO/ACN 15:85 (v/v) 100mM. El extracto se homogeneizó en vortex y centrifugó 10min a 15000rpm a 4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó para la inyección en el cromatógrafo líquido de alta eficacia 1290 UHPLC, acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo 6290 QqQ/MS (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). La columna cromatográfica usada fue una Acquity UPLC BEH HILIC de 1.7 μ m de diámetro interno y 2.1x100mm de diámetro externo y longitud respectivamente (Waters, Milford, USA). Las fases

móviles utilizadas fueron acetato de amonio 100mM (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). El flujo se mantuvo a 0.4mL/min. El gradiente de concentraciones para la elución fue el siguiente: 0-1min 85%B, 2min 20%B, 2-3min 20%B isocrático, 3-3.5min 15%B, 3.5-7min 15%B isocrático y 8min 85%B. Además se dejó 1.5min para dejar eluir impurezas tras cada muestra. El volumen inyectado por muestra fue de 2 μ L.

Las condiciones del detector de ionización por electrospray (ESI) fueron de 150°C y un flujo de 12L/min del gas secante, 20psi de presión para el gas nebulizador, 320°C y 12L/min el flujo para el gas protector, 3500V de voltaje capilar y 500V el de la boquilla. El cuadrupolo QqQ trabajó en modo MRM, adquiriendo así polaridad positiva, con un voltaje para la fragmentación de 380V y de 3V para la aceleración de las células.

Los resultados se recibieron en unidades de concentración molar (nM/L) para la nicotinamida (NAM), el ácido nicotínico (NA), el ribósido (NR) y mM para el mononucleótido de nicotinamida (NMN). A continuación convertimos los datos a μ g/100mL mediante el uso de sus pesos molares respectivos y sumamos todos los valores con el cometido de obtener el total de niacina contenido en la leche materna (NIACINA).

Por otro lado calculamos los equivalentes de niacina de la leche materna mediante la relación establecida para el triptófano, aminoácido precursor de la niacina según la cual 60mg triptófano equivalen a 1mg niacina.

3.4.5 MicroARNs

3.4.5.1 Selección de los microARNs

Los microARNs se seleccionaron tras una búsqueda bibliográfica entre Febrero y Mayo de 2013 en base a cinco criterios:

- microARNs con posibles efectos moduladores de la expresión génica de leptina, adiponectina y/o sus receptores (133, 195-204)
- microARNs con potenciales efectos sobre parámetros relacionados con la obesidad (205-210)
- microARNs relacionados con factores nutricionales (211-215)
- microARNs presentes en leche materna (47, 49, 216-218) y,
- microARNs que sirvan como controles positivos o negativos, así como genes para la normalización interna de los resultados (195, 219-224).

Se llevó a cabo una búsqueda de microARNs cuyas dianas de regulación fueran los genes de codificación de la leptina y la adiponectina así como de sus respectivos receptores; particularmente a nivel del estómago, asociado a la hipótesis de que dichos microARNs podrían

ser reguladores de su expresión en las células del tracto digestivo, pudiendo así ejercer un papel modulador de la ingesta y tener por tanto un rol clave en la programación metabólica temprana.

El ARN mensajero de la leptina se ha encontrado previamente en el tracto digestivo fetal humano, así como la isoforma larga del receptor de leptina, Ob-Rb (203). Este hecho deja abierta la posibilidad de que tenga un papel funcional sobre el desarrollo del tracto digestivo temprano y que ello influya definitivamente en su futura función reguladora sobre el metabolismo. En cuanto a la adiponectina, su interés recae sobre su papel protector en el desarrollo de alteraciones metabólicas.

Con el fin de predecir los microARNs que se dirigen a los genes especificados anteriormente hemos utilizado métodos computacionales basados en la complementariedad de los microARNs sobre sus ARNm diana (195). Entre las distintas interfaces disponibles (225), se utilizaron TargetScan 6.2 (www.targetscan.org) actualizado recientemente a la versión 7.1 (226), PicTar (pictar.mdc-berlin.de) actualizada por última vez en Marzo de 2007 y Miranda (www.microrna.org) actualizada por última vez en Noviembre de 2010. Los microARNs que resultaron tras la búsqueda y análisis de la complementariedad con los genes de interés se muestran en la Tabla 3.2. De entre todos ellos, se seleccionaron los enumerados a continuación por disponer de los primers en el mercado además de compartir complementariedad para varios de los genes de interés: miR-150, miR-30a-5p, miR-181a, miR-27a, miR-27b, miR-200b, miR-let7a, miR-let7b, miR-let7c, miR-451, miR-26a.

Nombre oficial en la base genómica de datos Entrez	Identificación del gen (ARNm 3'UTR)	MicroARNs diana
Leptina	NM_000230	miR-27a miR-27b miR-146b miR-17 miR-30a-5p
Receptor de la leptina isoforma 1	NM_002303	miR-150 miR-181a let-7a let-7b let-7c
Receptor de la leptina isoforma 3	NM_001003679	miR-30a-5p miR-384 miR-200b

Nombre oficial en la base genómica de datos Entrez	Identificación del gen (ARNm 3'UTR)	MicroARNs diana
Adiponectina	NM_004797 NM_01177800	miR-451 miR-181a miR-200b miR-27a miR-27b miR-153 miR-143 let-7b let-7c
Receptor de la adiponectina 1	NM_015999	miR-221 miR-222 miR-26a miR-26b
Receptor de la adiponectina 2	NM_024551	let-7a let-7b let-7c miR-150 miR-200b miR-17

Tabla 3.2 Estudio de complementariedad entre los genes diana de interés y los microARNs a seleccionar.

Así mismo, se seleccionaron dos microARNs que se expresan en tejido adiposo como el miR-17 y el miR-95 (208, 210, 227), otros que se han relacionado con el metabolismo lipídico y la adipogénesis como los microARNs, miR-384, miR-143, miR-103, miR-107, miR-221 y el miR-222 (221) y dos más que se han identificado alterados en la obesidad como el miR-26b y el miR-146b (204-206).

También se seleccionaron algunos microARNs que han sido relacionados con la ingesta de nutrientes específicos como el miR-126 que se incrementa en una dieta alta en hidratos de carbono en los seres humanos (219) o el miR-122a que se ve afectado por una dieta rica en grasas y baja en hidratos de carbono (211). El miR-145 presenta niveles bajos en plasma de crías cuyas madres fueron alimentadas con una dieta rica en grasas antes de la gestación, y los

miR-539 y miR-153 se han relacionado con la ingesta de biotina, una vitamina con funciones metabólicas importantes durante el desarrollo.

Finalmente, se seleccionó el miR-148a por ser el más abundante en leche humana por su potencial uso como control positivo. Tiene como diana al gen DNMT3B que codifica para la síntesis *de novo* de la enzima metiltransferasa, responsable de la metilación del ADN durante el desarrollo temprano. Su presencia en leche aumenta con la lactancia por lo que se ha sugerido una posible función inhibidora de la metilación en células del tracto digestivo infantil (47, 216). Así, se seleccionaron un total de 26 microARNs con potencial interés en la programación temprana de la obesidad y 4 genes constitutivos para la normalización interna de los resultados (RNU6B, U6 snRNA, Z30 y RNU66), de los cuales, se utilizó el U6 snRNA tras la puesta a punto del protocolo debido a su menor variabilidad entre las muestras de leche humana analizadas.

3.4.5.2 Preparación de la muestra

Para el análisis de microARNs en muestras de leche materna, se siguieron los pasos descritos anteriormente (220) con pequeñas variaciones que se detallan a continuación.

Para el procesamiento de la muestra se tomaron 100µL de leche. Las muestras se descongelaron en hielo, se homogeneizaron con vortex durante 10 segundos y se diluyeron en 500µL de la solución de lisis de acuerdo a las especificaciones del kit de extracción de ARNs de pequeño tamaño (*mirVana miRNA Isolation Kit AM1561*, Ambion). Seguidamente se llevaron a cabo todos los pasos detallados en el protocolo del kit de extracción hasta llegar al filtrado final de los ARNs de pequeño tamaño que se eluyeron en agua libre de nucleasas precalentada a 95°C.

3.4.5.3 Test de calidad de los ARNs de pequeño tamaño purificados

Tras la purificación de los ARN de pequeño tamaño se realizó un análisis del rendimiento y la calidad de la extracción (ratio 260:280) mediante espectrometría (NanoDrop™ 1000, Wilmington, DE) y electroforesis capilar (Agilent 2100 Bioanalyzer y Agilent Small RNA kit, Agilent Technologies). Ello permitió cuantificar el contenido de las muestras en ARN total, ARNs de pequeño tamaño (6 a 150 nucleótidos) y microARNs (10 a 40 nucleótidos). La calidad de la purificación se evaluó mediante la observación de los electroferogramas.

3.4.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR)

Los microARNs individuales se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa precedida de una retrotranscripción específica (RT-qPCR) usando la tecnología de sondas TaqMan.

Para ello las muestras purificadas se ajustaron a 2,5ng/μL de ARNs de pequeño tamaño en agua libre de nucleasas. Entonces se tomaron 5μL para iniciar la transcripción reversa a ADN copia en 4μL de mix (TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems) y 1,5μL de los primers específicos para el microARN a cuantificar en cada caso (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystems). La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 16°C durante 30min; 42°C durante 30min y 85°C durante 5min. Finalmente, 2μL del ADN copia específico para el microARNs en cuestión se amplificaron en una mix específica con su sonda respectiva (TaqMan Universal PCR master mix, Applied Biosystems). Los kits adquiridos para la determinación de los microARNs seleccionados se enumeran a continuación, de acuerdo a la nomenclatura de la base de datos miRBase (228): hsa-let-7a: 000377; hsa-miR-221: 000524; hsa-let-7b: 000378; hsa-miR-222: 002276; hsa-let-7c: 000379; hsa-miR-26a: 000405; hsa-miR-103: 000439; hsa-miR-26b: 000407; hsa-miR-122a: 000445; hsa-miR-27a: 000408; hsa-miR-126: 002228; hsa-miR-27b: 000409; hsa-miR-143: 000466; hsa-miR-30a-5p: 000417; hsa-miR-145: 002278; hsa-miR-384: 000574; hsa-miR-146b: 001097; hsa-miR-451: 001105; hsa-miR-148a: 000470; hsa-miR-539: 001286; hsa-miR-150: 000473; hsa-miR-95: 000433; hsa-miR-17: 002308; mmu-miR-153: 001191; hsa-miR-181a: 000480; hsa-miR-200b: 002251; U6 snRNA: 001973.

La reacción entre el ADN copia específico y la sonda fluorescente se llevó a cabo en un sistema de PCR a tiempo real (StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems). La amplificación se inició a 95°C durante 10 minutos seguida de 40 ciclos para la desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, anillamiento y extensión a 60°C durante 1 minuto.

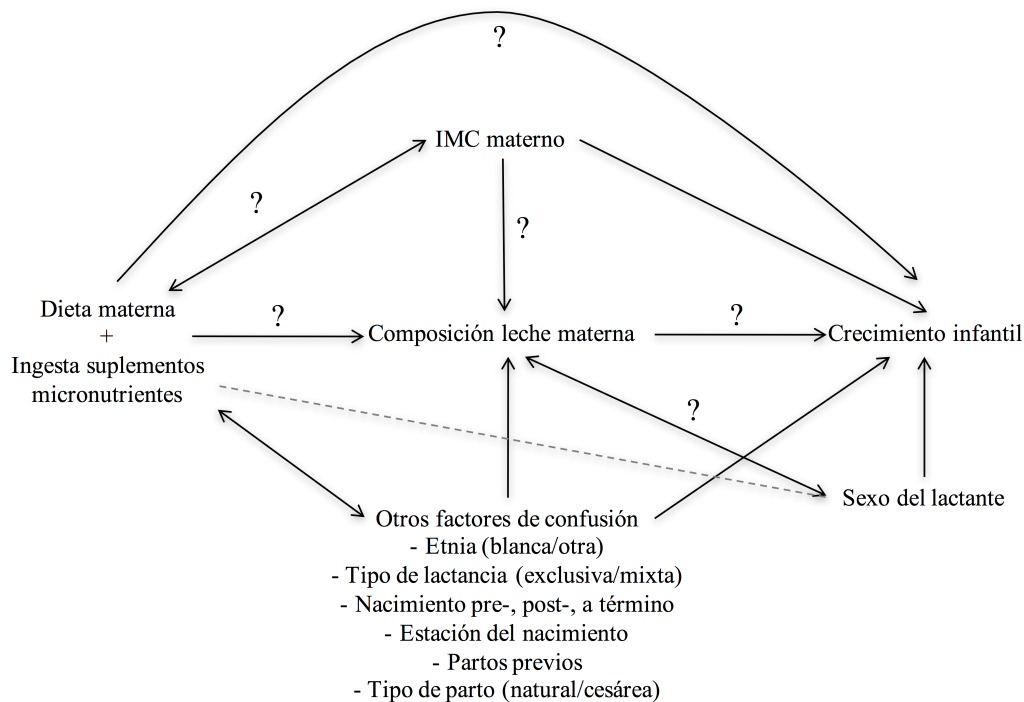
3.4.5.5 Análisis de los resultados

El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando el algoritmo LinRegPCR para el cálculo de los ciclos umbral de inicio de la fluorescencia (Cq) y la eficiencia de la amplificación. Los datos de Cq>37 se excluyeron del análisis, así como aquellos microARNs para los que el *primer* utilizado no mostró una eficiencia técnica suficiente para considerar válidos los resultados.

A continuación se realizó una normalización de los datos usando el gen U6 snRNA (224, 229-233). Así, la aplicación de la fórmula $2^{-(Ct\ U6\ snRNA - Ct\ miR)}$ permitió obtener las cantidades relativas para cada uno de los miR específicos (230), posteriormente se llevó a cabo un estudio de datos atípicos o *outliers* para descartar valores mal corregidos por el *housekeeping* y artefactos claros que causaban una gran variabilidad en la muestra poblacional estudiada.

3.5 Análisis estadístico de los resultados

El objetivo final del análisis estadístico ha sido dibujar un mapa de relaciones entre variables que resuman la ingesta alimentaria, componentes de la leche materna y sus efectos independientes o conjuntos sobre el crecimiento infantil como predictor del desarrollo de obesidad en la edad adulta, teniendo en cuenta las variables de confusión (tales como etnia, edad, edad gestacional, tipo de parto, tipo de lactancia, estación del nacimiento o partos previos), de exposición (consumo de suplementos nutricionales) o inherentes al crecimiento infantil (sexo del lactante). La Figura 3.1 presenta un diagrama del diseño estadístico.



Diseño estadístico. Representación esquemática del planteamiento y análisis estadístico. La hipótesis se centra en el potencial de la dieta para influir sobre la composición de la leche materna y así modular el crecimiento infantil.

3.5.2 Software utilizado

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software R para análisis de datos estadístico, gráfico y de programación (R Fundación para el Análisis de Datos Estadístico, Viena, Austria; <http://CRAN.R-project.org>). Se trata de un programa de libre acceso cuyo entorno de trabajo es extensible, por lo que permite manejar tanto grandes cantidades de datos compuestos en matrices como descargar paquetes que amplifican el sistema y permiten trabajar con numerosos modelos matemáticos propios de la estadística moderna.

3.5.3 Factores de interés y variables de confusión del estudio

El sobrepeso u obesidad materna durante la lactancia y, en menor medida, el sexo del lactante son los factores de interés en este estudio, por lo que el análisis estadístico está focalizado en determinar diferencias entre grupos en base a ambos factores por separado y simultáneamente.

El IMC materno utilizado para la agrupación resulta del promedio de cuatro registros del peso corporal, uno reportado antes del embarazo y los otros a los meses 1, 2 y 3 tras el parto. Así, se clasificaron todas las madres en función de si su IMC superaba o no el valor de 25kg/m^2 que delimita el normopeso del sobrepeso-obesidad.

Por otro lado, las variables de confusión que se han tenido en cuenta durante el análisis y/o para la interpretación de los resultados han sido la etnia, la edad materna, el número de partos previos, la estacionalidad del nacimiento, el tipo de parto (natural o por cesárea), la edad gestacional y el tipo de lactancia (exclusiva o mixta). No se ha considerado la influencia de otras variables confusoras como podría ser el hábito tabáquico, el estatus socioeconómico y el nivel educativo, la práctica de actividad física, la duración total de la lactancia o la alimentación complementaria, al no tener información contrastada suficiente para ello.

3.5.4 Tratamiento estadístico de las variables de estudio

Las variables que resultan de la valoración de la ingesta alimentaria y aquellas que componen el estudio analítico de los distintos componentes de la leche materna determinados proporcionaron los datos crudos para la evaluación del estatus nutricional y de la composición de la leche materna respectivamente. En casos concretos los datos crudos fueron transformados para la realización de análisis estadísticos determinados, en cuyo caso se describe en detalle en los capítulos correspondientes.

En el estudio del crecimiento infantil se utilizó la función *igrowup.standard* del paquete estadístico *igrowup*, disponible en la página web de la OMS (<http://www.who.int/childgrowth/software/en/>) y que permite comparar los parámetros antropométricos respecto de los estándares de la OMS, así como obtener los z-scores para cada dato antropométrico e individuo (150, 151, 234). Este paquete contiene los códigos para las funciones de cálculo de los z-scores a partir de los datos antropométricos disponibles y las tablas de referencia de los estándares de crecimiento infantil de la OMS. Se llevó a cabo un análisis longitudinal, teniendo en cuenta que los períodos temporales de las medidas para los parámetros de crecimiento de los niños/as son desiguales. Para ello se utilizó un modelo lineal mixto (con factores fijos y aleatorios) que tiene en cuenta la estructura de la matriz de covarianza. Este modelo evita la asunción de que las distancias entre todas las medidas son iguales para todas las repeticiones tal y como ocurre en el análisis de la varianza o ANOVA de medidas repetidas. Esto supone una mejora en la estimación estadística puesto que las medidas

más próximas entre sí están más fuertemente correlacionadas que aquellas que distan más en el tiempo. Para dicho fin se utilizó la función *lme* del paquete estadístico *nlme*. Este modelo de regresión múltiple o multivariado permite incorporar simultáneamente y por tanto ajustar, corregir y evaluar la influencia de distintas variables (X_1 , X_2 , X_3 ...) relacionadas significativamente con el resultado de interés (el componente Y).

3.5.5 Análisis exploratorio de datos

Los datos de las diferentes variables se recogieron, organizaron y estructuraron en una base de datos manejable por Excel y Spss. A continuación se llevó a cabo un examen gráfico de la naturaleza de las variables individuales a analizar incluyendo el análisis descriptivo numérico de los datos. Se han calculado las medias y se han analizado los valores mínimos y máximos, la distribución de casos y los datos que pudieran considerarse anómalos (*outliers*) y por tanto susceptibles de ser excluidos del análisis final. También se han comprobado los supuestos subyacentes en la mayor parte de las técnicas multivariantes (normalidad, linealidad, homocedasticidad). Los gráficos de cajas o *boxplots* a partir de los cuales se descartaron algunos datos atípicos considera a éstos cuándo se sitúan más allá de 1.5 puntos el rango inter-cuartil en ambos sentidos y partiendo del valor correspondiente al primer y tercer cuartil.

Una vez las variables de estudio fueron caracterizadas, el análisis estadístico prosiguió con comparaciones simples en base a tests de la varianza, de la t de Student y ANOVAs de 1 y 2 factores para las variables cuantitativas y Chi cuadrado para las cualitativas. En los análisis que incluían el factor tiempo (mes 1, 2 y 3 de lactancia) se ha utilizado la ANOVA de medidas repetidas.

La evaluación de las correlaciones entre variables cuantitativas o el efecto de variables categóricas sobre otras continuas se llevó a cabo mediante modelos lineales simples. Estos permitieron así mismo la inclusión de varios factores de confusión o interés simultáneamente para evaluar la robustez de sus efectos independientes, así como la posible mejora del modelo, que por tanto explicarían el resultado simultáneamente.

Así mismo, la función *comparegroups* fue utilizada para la preparación de las tablas que resumen las características de la población así como para comparar éstas mismas en base al IMC promedio materno y el sexo de los lactantes. Esta función pertenece al paquete estadístico con el mismo nombre diseñado para el análisis descriptivo por grupos. Dependiendo de la naturaleza de las variables, continuas o categóricas, se calculan automáticamente distintos estadísticos (media, mediana, frecuencias, incidencias) y permite la ejecución de los tests adecuados para el análisis comparativo (t -Student, análisis de la varianza, Kruskal-Wallis, Fisher, log-rank,...). El análisis de la interacción entre dos o más factores de interés se realizó

mediante análisis de la varianza o ANOVA de dos factores acompañada de un análisis post-hoc de Tukey para explorar entre qué grupos concretos se da la diferencia estadística.

En el análisis de los resultados sobre la caracterización de la composición de la leche materna se utilizaron las mismas herramientas estadísticas que en la caracterización de la población de estudio y el análisis longitudinal utilizado en el análisis del crecimiento infantil sirvió para evaluar los cambios de composición a lo largo de los tres primeros meses de lactancia materna.

3.5.6 Análisis estadísticos complejos

3.5.6.1 Correlogramas y agrupaciones jerárquicas

Se profundizó en el análisis descriptivo mediante el uso de correlaciones múltiples y su visualización gráfica a través de correlogramas. Para ello se usaron las funciones *cor* y *corrplot* dentro de los paquetes estadísticos *Hmisc* y *corrplot*. Los correlogramas incluyeron de forma intrínseca un análisis jerárquico de agrupación de las variables (*hierarchical clustering*).

Los correlogramas visibilizan los coeficientes de correlación de Pearsons que establecen la intensidad de la relación lineal que existe entre dos variables continuas. De manera similar a un modelo lineal simple, el factor de correlación de Pearsons es el mismo que el coeficiente de regresión lineal (R^2).

3.5.6.2 Análisis de componentes principales

En este estudio se realizaron varios PCAs en la identificación de patrones de ingesta específicos por nutrientes (perfiles nutricionales) y por grupos de alimentos (patrones de consumo), así como de distintos componentes de la leche (perfiles de ácidos grasos y aminoácidos) con el objetivo de identificar los nutrientes que explicaran la mayor parte de la variabilidad de la muestra poblacional estudiada tanto en la dieta como en la leche materna.

El análisis de componentes principales (PCA) es un análisis multivariado que reduce la dimensionalidad de los datos siendo de gran utilidad cuando un grupo de datos se compone de variables muy correlacionadas entre ellas y cuando hay un número elevado de variables en comparación con el número de observaciones, tal como ocurre en la evaluación de la composición de la dieta y de la leche materna. Así, el PCA transforma un conjunto de variables extenso en otro set más reducido que responden a combinaciones lineales de la matriz original. Las nuevas variables generadas no están correlacionadas entre sí y explican en orden decreciente la variabilidad de la muestra.

Los distintos PCAs llevados a cabo partieron de una matriz de datos transformados en una matriz de correlación o de covarianza en función de si existían grandes diferencias en la escala entre variables, en cuyo caso se utilizó la matriz de correlación; o si se preveía una baja

diferenciación entre componentes extraídos, en cuyo caso el uso de la matriz de covarianza maximiza las variables responsables de la mayor parte de la variabilidad en la muestra.

Además se probaron varias alternativas de normalización de los datos mediante las funciones *scale*, *center* y *log* que responden a los conceptos de escalar (igualar escalas/unidades entre variables), centrar (relativizar los datos en base a una variable) y aplicar el logaritmo neperiano. La selección de una u otra alternativa respondió a dos criterios, por un lado utilizar el menor número de tratamientos de los datos posible y por otro obtener un resultado interpretable y lo mejor resumido posible.

El método de descomposición de la matriz utilizado fue el espectral o *eigen* que trabaja mediante un análisis de las correlaciones o las covarianzas existentes entre variables, a diferencia del método singular que analiza las correlaciones o covarianzas entre las muestras. Esta distinta aproximación responde a distintas características de la matriz, ya que la primera asume que son las variables las que están fuertemente correlacionadas, mientras que la segunda focaliza en la relación entre las muestras.

El número de componentes principales retenidos o patrones de ingesta se llevó a cabo teniendo en cuenta la potencial interpretación de los patrones, el porcentaje del total de la varianza explicada y las inflexiones visuales de los gráficos de sedimentación (*screeplot*) a partir de los coeficientes de los componentes extraídos (235).

Para cada componente extraído se obtuvieron los coeficientes de los componentes o valores propios (*loadings*) que cada variable toma parte de dicho componente. Los coeficientes representan la correlación entre las variables originales y los componentes extraídos. Un coeficiente positivo indica una correlación positiva entre la variable y el componente del que forma parte, mientras que un coeficiente negativo indica una correlación inversa.

Finalmente se calcularon las puntuaciones de los individuos o muestras (*scores*) para cada componente. Estas puntuaciones hacen referencia a la adherencia de cada individuo o muestra a cada uno de los componentes extraídos. Además, la matriz de puntuaciones sirvió para el análisis estadístico posterior al PCA, para la asociación de los patrones y perfiles definidos con distintas variables antropométricas y de composición de la leche materna.

El estudio del perfil de ingesta de nutrientes partió del promedio de los recordatorios de 24h teniendo y sin tener en cuenta la ingesta de los suplementos. Las variables se transformaron a escala logarítmica y fueron ajustadas a la ingesta energética mediante el método de los residuos de nutrientes (176) antes de proceder con los PCAs sobre la matriz de covarianza, tal y como ha sido recientemente descrito (235).

El método de los residuos mediante el cual se ajustó la ingesta de nutrientes al total energético se describe a continuación. Para cada nutriente, en escala logarítmica se aplicó un análisis de regresión lineal donde la ingesta del mismo fue la variable dependiente mientras la ingesta total energética fue la variable independiente. La ecuación resultante se usó para calcular el promedio esperado para la ingesta de cada nutriente en la población de estudio respecto del promedio de ingesta energética. A continuación, para cada individuo se calculó la ingesta ajustada sumando la ingesta promedio esperada sobre el residuo correspondiente que resulta del análisis de regresión. Esta aproximación permitió extraer la información de la variación en la composición de la dieta *per se*, eliminando el efecto de una mayor o menor ingesta de manera cuantitativa y relegando la importancia a la ingesta de los macro- y micronutrientes de forma proporcional respecto del total ingerido.

La selección de los nutrientes a incluir en el análisis vino determinada por la relevancia de los mismos en la dieta, así como por la disponibilidad de datos comparables en la bibliografía. Así, los nutrientes considerados fueron: proteínas, almidón, azúcares, fibra dietética, AGS, AGMI, AGPI, colesterol, tiamina, riboflavina, vitamina B6, folatos, vitamina B12, vitamina C, retinoides, beta-caroteno, vitamina D, vitamina E, calcio, hierro, magnesio, potasio y fósforo.

El estudio de los patrones de ingesta de alimentos partió también del promedio de los recordatorios de 24h registrados en forma de energía aportada por cada uno de los catorce grupos de alimentos. Los datos fueron normalizados al referir el aporte energético de cada grupo de alimentos por cada 1000 kilocalorías ingeridas (236).

Habitualmente se usan los resultados en g/día por grupo de alimentos para el estudio de los perfiles de ingesta de alimentos (237, 238), sin embargo, en nuestro estudio no pudimos obtener estos datos a partir del programa de valoración dietética. Así, asumimos que los resultados en kcal/día son equiparables a los g/día (entre ambos solo existe un factor de conversión en base al aporte calórico de cada nutriente). La normalización aplicada resumió mejor los datos, su interpretabilidad y asociación con variables de interés, además de parecernos necesaria al igual que se aplica una corrección por la ingesta energética en el análisis de los perfiles nutricionales. En este caso se trabajó a partir de la matriz de correlaciones al no poder asumir tal y como ocurre con la ingesta de nutrientes que la ingesta de los distintos grupos de alimentos sean variables altamente interrelacionadas entre ellas.

Los PCAs del perfil de ácidos grasos y aminoácidos en leche materna partieron de la matriz de correlaciones a partir del promedio de los resultados de las tres determinaciones, en forma de porcentajes relativos y concentraciones para cada caso, respectivamente con el objetivo de homogeneizar las diferencias escalares entre variables debido a su mayor o menor presencia en la muestra.

Del perfil de AG se llevó a cabo un primer PCA que identificó varios AG sin relevancia en la explicación de la varianza muestral, por lo que fueron obviados del PCA final. Éstos fueron el caprílico (C8:0), esteárico (C18:0), nonadecanoico (C19:0), araquídico (C20:0), heneicosanoico (C21:0), cis-vaccénico (C18:1n7), palmitolinoleico (C16:2n4), linoleico (C18:2n6c), alfa-linolénico (C18:3n3), estearidónico (C18:4n3), EPA (C22:5n3), DHA (C22:6n3), trans-7-octadecenoico (C18:1n11t), elaídico (C18:1n9t) y linoleico conjugado (t10,c12-CLA). Así se pasó de explicar un 55.3% la varianza muestral con cuatro componentes extraídos a explicar un 81.2% con seis componentes, además de facilitar la interpretación de los mismos.

3.5.6.3 Modelos lineales mixtos y de ecuaciones estructurales

La construcción de los diagramas para el estudio de potenciales mediadores del efecto del IMC materno, la dieta u otros factores sobre la predisposición a la obesidad infantil partió del uso de modelos lineales simples y mixtos. Estos últimos incluyeron todas las variables de crecimiento infantil registradas entre el nacimiento y los dos años de edad, tal como se ha explicado previamente (capítulo 3.5.4), por lo que los resultados adquieren mayor potencia estadística y se refieren a la trayectoria de crecimiento infantil para el peso o el IMC corporal, normalmente ajustados por sexo y relativos a los estándares de la OMC en forma de z-scores.

Tras la construcción de las hipótesis de mediación usamos modelos de ecuaciones estructurales (Structural Equation Modelling (SEM)) para determinar el papel mediador de distintos componentes de la leche materna en la relación entre el IMC materno, la ingesta de algún nutriente u otras variables como la estación del parto sobre una variable antropométrica resumen de la predisposición a la obesidad de la descendencia tal como la velocidad de crecimiento (zwei6.0), el IMC a los dos años de edad (zbmi24) o en algún caso puntual, el peso corporal en kilogramos a los dos años de edad. Este análisis se llevó a cabo usando el paquete estadístico para R *Lavaan*.

La adecuación del modelo se evaluó mediante criterios estandarizados (239) de manera que el estadístico SRMR (Square Root Mean Residual) obtuviera valores por debajo de 0.08, lo cual indica una buena adecuación del modelo a los datos y el índice comparativo CFI (Comparative Fit Index) obtuviera valores superiores a 0.95, lo cual indica una adecuación excelente del modelo a los datos.

Todos los tests estadísticos fueron analizados de acuerdo a un umbral de significancia de $p \leq 0.05$.

4. Resultados y Discusión

4.1 Caracterización de la población de estudio

Se ha caracterizado una cohorte de 59 mujeres lactantes y sus respectivos bebés, reclutadas a través de tres centros de salud (35.6% Palma centro ciudad, 22.0% Alrededores, 42.4% Manacor), mayoritariamente de etnia blanca (89.8%) y de 32.0 ± 3.48 años de edad (Tabla 4.1).

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
Centro de Salud:				0.733			0.189					0.691
Palma centro	21	12	9		8	13		5	3	7	6	
Alrededores	13	9	4		9	4		7	2	2	2	
Pueblo afueras	25	17	8		14	11		10	4	7	4	
Grupo étnico:				0.656			0.092					0.220
Blanca	53	35	18		30	23		21	9	14	9	
Otro grupo étnico	6	3	3		1	5		1	0	2	3	
Partos previos:				0.905			1					1
No	43	27	16		23	20		16	7	11	9	
Si	16	11	5		8	8		6	2	5	3	
Tipo de parto:				0.026			0.036					0.010
Cesárea	10	3	7		2	8		1	1	2	6	
Natural	49	35	14		29	20		21	8	14	6	
Estación de nacimiento:				0.988			0.404					0.713
Invierno (21Dic-21Jun)	38	25	13		22	16		16	6	9	7	
Verano (21Jun-21Dic)	21	13	8		9	12		6	3	7	5	
Semanas nacimiento:				0.181			1					0.447
Post-término (>42 semanas):	3	1	2		2	1		1	1	0	1	
Pre-término (<37 semanas)	5	2	3		3	2		1	2	1	1	
A término (37-42 semanas)	51	35	16		26	25		20	6	15	10	
Tamaño para la edad gestacional:				0.173			1					0.322
Adecuado	53	36	17		28	25		21	7	15	10	
Pequeño	6	2	4		3	3		1	2	1	2	
Sexo:				0.404			<0.001					<0.001
Niña	31	22	9					22	9	0	0	
Niño	28	16	12					0	0	16	12	
Consumo suplementos:				0.378			0.848					0.477
No	25	14	11		14	11		8	6	6	5	
Si	34	24	10		17	17		14	3	10	7	

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
Tipo de lactancia (Mes 1):				0.019			1					0.044
Exclusiva	51	36	15		27	24		20	7	16	8	
Mixta	8	2	6		4	4		2	2	0	4	
Tipo de lactancia (Mes 2):				0.258			1					0.527
Exclusiva	50	34	16		26	24		19	7	15	9	
Mixta	9	4	5		5	4		3	2	1	3	
Tipo de lactancia (Mes 3):				0.189			0.403					0.346
Exclusiva	46	32	14		26	20		19	7	13	7	
Mixta	13	6	7		5	8		3	2	3	5	
Edad materna (años)	32.0 (3.48)	32.2 (3.42)	31.6 (3.65)	0.546	31.8 (3.19)	32.2 (3.83)	0.714	32.2 (3.07)	30.9 (3.48)	32.2 (3.95)	32.2 (3.83)	0.502
IMC materno (kg/m2)	24.1 (4.44)	21.4 (1.85)	28.9 (3.66)	<0.001	23.8 (4.05)	24.4 (4.90)	0.656	21.7 (1.79)	29.1 (3.01)	21.1 (1.94)	28.7 (4.21)	0.896
Edad gestacional (semanas)	39.1 (1.74)	39.2 (1.56)	38.8 (2.02)	0.384	39.1 (1.84)	39.0 (1.64)	0.950	39.4 (1.50)	38.2 (2.39)	38.9 (1.65)	39.2 (1.70)	0.143

Tabla 4.1 Tabla de contingencia de la frecuencia y distribución de los casos según las variables descriptivas registradas y variables cuantitativas descriptivas y antropométricas maternas que resumen las principales características de la cohorte reclutada expresadas como la media (desviación estándar). Los resultados se presentan para el total de la cohorte estudiada y segregados en función del IMC materno y sexo del lactante. El análisis estadístico de las variables cualitativas se ha realizado mediante el test de Chi cuadrado o de Fisher para tamaños muestrales reducidos, según selección automática de la función *compareGroups* del paquete estadístico con el mismo nombre para el software de análisis estadístico R. El IMC materno es resultado de promediar los 4 valores registrados durante el estudio. Los análisis estadísticos utilizados para las variables cuantitativas son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Un 27.1% de las mujeres había tenido partos previos, un 16.9% de los partos incluidos en el estudio fueron por cesárea y el 64.4% tuvieron lugar durante los meses comprendidos entre el 21 de Diciembre y el 21 de Junio, coincidiendo con las estaciones de Invierno y Primavera. En relación al momento gestacional en el que tuvo lugar el parto, el 86.4% fue a término con tres casos post-término y cinco pre-término y una edad gestacional promedio de 39.1 ± 1.74 semanas.

La población mostró una distribución relativamente equilibrada de sexos entre los lactantes (52.5% niñas, 47.5% niños), al igual que de nº de madres que consumían suplementos durante los meses de lactancia (42.4% no consumieron, 57.6% sí lo hicieron). En relación al tipo de lactancia, la mayor parte siguió lactancia exclusiva durante los tres meses tras el parto (entre un 77.9% y el 86.4% dependiendo del mes registrado), sin embargo, 8 mujeres al primer mes, 9 al segundo y 13 al tercer mes tras el parto siguieron lactancia mixta.

Además, un 35.6% de la cohorte de mujeres presentaba un $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$ durante la lactancia, con un IMC promedio de $28.9 \pm 3.66 \text{kg/m}^2$ frente a un IMC promedio de $21.4 \pm 1.85 \text{kg/m}^2$ que presentaron las mujeres con normopeso. En el grupo de mujeres con $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$ encontramos un 66.6% con sobrepeso ($25 > IMC < 30 \text{kg/m}^2$) y un 33.3% con obesidad ($IMC > 30 \text{kg/m}^2$), pero ningún caso de obesidad mórbida ($IMC < 40 \text{kg/m}^2$).

Se obtuvieron diferencias significativas en la distribución de los casos entre grupos en base al tipo de parto y el tipo de lactancia.

La distribución de individuos teniendo en cuenta el tipo de nacimiento presentó diferencias para todas las agrupaciones. Es decir, se observaron diferencias significativas en base al tipo de parto, natural o cesárea, dependiendo del IMC materno ($p=0.026$) y del sexo del lactante ($p=0.036$), además de identificar un efecto interacción entre ambos factores ($p=0.010$). Por este motivo, el tipo de parto se consideró una variable de confusión en el presente estudio. Concretamente hubo 10 partos por cesárea y 49 naturales cuya distribución nos indica que se hizo más probable una cesárea en mujeres con sobrepeso u obesidad que tuvieron un niño. La mayor prevalencia de partos por cesárea entre la población de mujeres con sobrepeso u obesidad es una observación ya presentada en varias ocasiones por la comunidad científica (240, 241).

En lo relativo al tipo de lactancia seguida, encontramos diferencias significativas en la distribución de las participantes hacia el primer mes de lactancia según el IMC materno ($p=0.019$) y cuando la agrupación incluyó también el sexo ($p=0.044$). Estos datos describen un mayor número relativo de mujeres ofreciendo lactancia mixta entre aquellas que presentaban sobrepeso u obesidad en comparación con el grupo de madres con peso normal. Sin embargo, la evolución de esta diferencia desaparece hacia el segundo y tercer mes de lactancia y su interpretación se puede relativizar por el hecho de que el grupo de madres con un $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$ es tres veces menor que el grupo con normopeso. Aun así, existen evidencias de lactancias

exclusivas más cortas debido al sobrepeso u obesidad materna, aunque se trata aún de un tema controvertido (242).

El resto de variables categóricas descriptivas así como las antropométricas cuantitativas referidas a las madres (edad y talla) no obtuvieron diferencias significativas entre grupos en base a los factores de interés del estudio.

4.1.1 Características antropométricas y de crecimiento infantil

En el nacimiento, la población estudiada presentó un peso de 3.2 ± 0.5 kg, 49.3 ± 2.6 cm de talla, 33.7 ± 1.4 cm de perímetro craneal (PC) y un IMC de 13.0 ± 1.5 kg/m². Ninguna de estas variables presentó diferencias significativas en función del sexo del recién nacido ni del IMC materno (Tabla 4.2).

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
		N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
Nacimiento	Peso (kg)	3.19 (0.52)	3.23 (0.44)	3.11 (0.64)	0.460	3.07 (0.53)	3.31 (0.48)	0.075	3.18 (0.41)	2.81 (0.70)	3.29 (0.48)	3.33 (0.51)	0.141
	Talla (cm)	49.3 (2.15)	49.3 (1.71)	49.3 (2.80)	0.986	48.9 (2.21)	49.7 (2.03)	0.140	49.1 (1.78)	48.5 (3.08)	49.6 (1.62)	49.9 (2.53)	0.454
	PC (cm)	33.7 (1.36)	33.9 (1.32)	33.4 (1.41)	0.192	33.4 (1.44)	34.1 (1.21)	0.059	33.6 (1.26)	32.9 (1.76)	34.3 (1.34)	33.8 (0.99)	0.743
	IMC (kg/m2)	13.0 (1.49)	13.3 (1.33)	12.7 (1.71)	0.183	12.8 (1.65)	13.3 (1.27)	0.169	13.2 (1.37)	11.8 (1.90)	13.3 (1.31)	13.3 (1.28)	0.081
	IP (kg/m3)	26.5 (2.80)	26.9 (2.56)	25.7 (3.10)	0.140	26.2 (3.20)	26.8 (2.31)	0.387	26.9 (2.85)	24.3 (3.39)	26.8 (2.21)	26.7 (2.54)	0.102
Mes 1	Peso (kg)	4.00 (0.71)	3.94 (0.68)	4.11 (0.78)	0.419	3.76 (0.68)	4.27 (0.67)	0.005	3.74 (0.64)	3.80 (0.80)	4.21 (0.64)	4.34 (0.72)	0.858
	Talla (cm)	53.0 (2.90)	52.8 (2.68)	53.3 (3.31)	0.615	52.2 (2.84)	53.8 (2.76)	0.029	52.2 (2.57)	52.3 (3.58)	53.7 (2.63)	54.0 (3.03)	0.913
	PC (cm)	36.5 (1.37)	36.4 (1.03)	36.7 (1.88)	0.629	36.2 (1.22)	36.9 (1.45)	0.065	36.4 (0.98)	35.7 (1.72)	36.5 (1.12)	37.3 (1.76)	0.063
	IMC (kg/m2)	14.1 (1.42)	14.0 (1.44)	14.3 (1.39)	0.438	13.7 (1.39)	14.6 (1.30)	0.010	13.7 (1.43)	13.7 (1.38)	14.5 (1.35)	14.8 (1.27)	0.794
	IP (kg/m3)	26.7 (2.47)	26.6 (2.64)	26.9 (2.18)	0.596	26.3 (2.52)	27.2 (2.36)	0.140	26.2 (2.75)	26.3 (2.00)	27.1 (2.50)	27.4 (2.26)	0.820
Mes 2	Peso (kg)	5.04 (0.82)	4.98 (0.81)	5.14 (0.86)	0.492	4.81 (0.76)	5.30 (0.83)	0.024	4.80 (0.81)	4.84 (0.65)	5.24 (0.76)	5.37 (0.95)	0.822
	Talla (cm)	56.5 (2.93)	56.4 (2.85)	56.7 (3.14)	0.729	55.8 (3.00)	57.3 (2.69)	0.046	55.8 (3.02)	55.8 (3.12)	57.3 (2.43)	57.4 (3.12)	0.968
	PC (cm)	38.4 (1.37)	38.4 (1.26)	38.3 (1.58)	0.881	38.1 (1.34)	38.7 (1.38)	0.146	38.2 (1.25)	37.9 (1.58)	38.6 (1.28)	38.7 (1.56)	0.593
	IMC (kg/m2)	15.7 (1.53)	15.6 (1.57)	15.9 (1.47)	0.443	15.4 (1.37)	16.0 (1.64)	0.100	15.3 (1.52)	15.5 (0.96)	15.9 (1.62)	16.2 (1.73)	0.815
	IP (kg/m3)	27.8 (2.63)	27.6 (2.70)	28.1 (2.52)	0.549	27.6 (2.58)	28.0 (2.70)	0.569	27.5 (2.78)	27.7 (2.18)	27.8 (2.68)	28.3 (2.82)	0.843
Mes 3	Peso (kg)	5.88 (0.84)	5.80 (0.77)	6.03 (0.96)	0.349	5.66 (0.78)	6.13 (0.85)	0.029	5.70 (0.80)	5.54 (0.75)	5.93 (0.72)	6.40 (0.97)	0.163
	Talla (cm)	59.9 (3.06)	59.8 (2.97)	60.1 (3.30)	0.717	59.4 (3.09)	60.4 (3.01)	0.230	59.5 (2.91)	59.3 (3.68)	60.2 (3.10)	60.7 (3.01)	0.685

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor	
	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12		
	PC (cm)	40.1 (1.44)	40.0 (1.27)	40.2 (1.74)	0.644	39.8 (1.28)	40.4 (1.57)	0.128	39.9 (1.15)	39.6 (1.62)	40.2 (1.44)	40.6 (1.76)	0.368
	IMC (kg/m2)	16.3 (1.37)	16.2 (1.30)	16.6 (1.49)	0.292	16.0 (1.42)	16.7 (1.21)	0.031	16.1 (1.57)	15.7 (1.00)	16.3 (0.82)	17.3 (1.47)	0.072
	IP (kg/m3)	27.4 (2.51)	27.2 (2.61)	27.7 (2.35)	0.444	27.0 (2.88)	27.8 (2.00)	0.225	27.1 (3.09)	26.6 (2.43)	27.2 (1.86)	28.5 (2.03)	0.202
Mes 6	Peso (kg)	7.51 (0.91)	7.44 (0.86)	7.66 (1.00)	0.401	7.25 (0.84)	7.80 (0.91)	0.020	7.34 (0.90)	7.03 (0.68)	7.56 (0.82)	8.12 (0.95)	0.068
	Talla (cm)	66.8 (2.74)	66.7 (2.75)	66.9 (2.78)	0.793	66.1 (2.86)	67.5 (2.43)	0.039	66.3 (2.97)	65.4 (2.63)	67.2 (2.43)	68.0 (2.47)	0.271
	PC (cm)	43.1 (1.38)	43.1 (1.40)	43.0 (1.36)	0.687	42.6 (1.20)	43.5 (1.42)	0.011	42.9 (1.19)	42.1 (1.12)	43.5 (1.62)	43.6 (1.17)	0.206
	IMC (kg/m2)	16.8 (1.33)	16.7 (1.24)	17.1 (1.49)	0.331	16.6 (1.28)	17.1 (1.38)	0.171	16.7 (1.34)	16.4 (1.16)	16.7 (1.14)	17.6 (1.56)	0.128
	IP (kg/m3)	25.2 (2.16)	25.1 (2.11)	25.5 (2.28)	0.432	25.2 (2.31)	25.3 (2.03)	0.812	25.2 (2.38)	25.1 (2.27)	24.9 (1.73)	25.9 (2.34)	0.395
Mes 12	Peso (kg)	9.42 (1.15)	9.31 (1.05)	9.63 (1.32)	0.343	9.02 (1.00)	9.87 (1.17)	0.005	9.16 (1.13)	8.69 (0.45)	9.51 (0.92)	10.3 (1.33)	0.029
	Talla (cm)	75.2 (2.97)	75.1 (2.95)	75.4 (3.07)	0.723	74.5 (3.07)	76.0 (2.71)	0.053	74.8 (3.21)	73.8 (2.76)	75.5 (2.60)	76.5 (2.86)	0.237
	PC (cm)	45.9 (1.26)	45.9 (1.17)	45.8 (1.43)	0.732	45.5 (1.05)	46.3 (1.38)	0.028	45.8 (0.95)	44.9 (1.01)	46.1 (1.44)	46.5 (1.31)	0.043
	IMC (kg/m2)	16.6 (1.34)	16.5 (1.19)	16.9 (1.56)	0.294	16.2 (1.11)	17.1 (1.45)	0.019	16.3 (1.18)	16.0 (0.92)	16.7 (1.21)	17.6 (1.61)	0.063
	IP (kg/m3)	22.1 (1.84)	22.0 (1.71)	22.4 (2.05)	0.390	21.8 (1.73)	22.5 (1.92)	0.193	21.9 (1.68)	21.7 (1.93)	22.1 (1.80)	23.0 (2.03)	0.267
Mes 18	Peso (kg)	10.9 (1.23)	10.7 (1.18)	11.1 (1.28)	0.222	10.6 (1.16)	11.2 (1.23)	0.041	10.7 (1.29)	10.3 (0.71)	10.8 (1.05)	11.8 (1.23)	0.026
	Talla (cm)	81.8 (3.00)	81.5 (2.79)	82.5 (3.34)	0.270	81.1 (3.00)	82.7 (2.83)	0.043	81.1 (2.85)	81.1 (3.53)	82.1 (2.68)	83.5 (2.94)	0.403
	PC (cm)	47.5 (1.16)	47.5 (1.12)	47.6 (1.26)	0.757	47.1 (1.05)	48.0 (1.10)	0.002	47.2 (1.07)	46.8 (0.99)	47.9 (1.09)	48.2 (1.14)	0.238
	IMC (kg/m2)	16.2 (1.13)	16.1 (1.16)	16.3 (1.07)	0.432	16.0 (1.09)	16.4 (1.16)	0.250	16.2 (1.18)	15.6 (0.73)	16.0 (1.16)	16.9 (0.96)	0.013

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
		N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
	IP (kg/m ³)	19.8 (1.41)	19.8 (1.44)	19.8 (1.38)	0.864	19.8 (1.43)	19.8 (1.41)	0.935	20.0 (1.35)	19.3 (1.56)	19.5 (1.56)	20.2 (1.12)	0.062
Mes 24	Peso (kg)	12.3 (1.45)	12.2 (1.42)	12.6 (1.53)	0.463	12.0 (1.49)	12.7 (1.33)	0.060	12.2 (1.63)	11.4 (0.79)	12.2 (1.06)	13.4 (1.38)	0.012
	Talla (cm)	87.6 (3.11)	87.4 (3.13)	88.0 (3.12)	0.512	86.8 (3.09)	88.7 (2.86)	0.024	86.9 (3.06)	86.3 (3.34)	88.2 (3.19)	89.3 (2.38)	0.328
	PC (cm)	48.5 (1.46)	48.5 (1.28)	48.6 (1.80)	0.878	48.1 (1.35)	49.0 (1.44)	0.027	48.3 (1.37)	47.4 (1.16)	48.9 (1.06)	49.2 (1.81)	0.160
	IMC (kg/m ²)	16.0 (1.29)	16.0 (1.25)	16.2 (1.40)	0.621	15.9 (1.29)	16.2 (1.31)	0.423	16.1 (1.33)	15.3 (1.02)	15.7 (1.12)	16.8 (1.33)	0.011
	IP (kg/m ³)	18.3 (1.50)	18.3 (1.47)	18.4 (1.60)	0.841	18.3 (1.47)	18.3 (1.57)	0.882	18.6 (1.36)	17.8 (1.67)	17.9 (1.57)	18.8 (1.46)	0.049
Velocidad crecimiento	zwei6-0 (z-scores)	0.76 (0.63)	0.61 (0.54)	1.01 (0.71)	0.031	0.75 (0.67)	0.76 (0.59)	0.966	0.58 (0.51)	1.18 (0.85)	0.66 (0.60)	0.89 (0.59)	0.269

Tabla 4.2 Caracterización del crecimiento de la población infantil de la cohorte de madres lactantes estudiada, desde el nacimiento hasta los dos años de edad. También se presenta la velocidad de crecimiento durante los primeros seis meses de vida tal y como se ha descrito en la metodología (capítulo 3.2.4). PC, perímetro craneal; IMC, Índice de masa corporal; IP, Índice ponderal. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

De la observación de los datos del peso al nacer, se identificaron seis recién nacidos con bajo peso al nacer ($<2.5\text{kg}$), de los cuales ninguno de ellos presentó muy bajo peso al nacer ($<1.5\text{kg}$), y otros tres se identificaron como macrosómicos por presentar un peso al nacer superior a los 4kg. Además, otros seis recién nacidos a término fueron clasificados como pequeños para su edad gestacional (PEG) por presentar un peso para la edad gestacional por debajo del percentil 10 de acuerdo a las curvas de crecimiento infantil utilizadas (162). Estos seis recién nacidos no coincidieron necesariamente con los seis casos identificados con un bajo peso al nacer. Por su parte ningún recién nacido resultó grande para su edad gestacional (GEG).

El valor del IP en el nacimiento es un indicador habitualmente usado en la evaluación del crecimiento fetal y para reconocer estados de extrema delgadez o una adiposidad elevada en recién nacidos. El promedio obtenido en la población estudiada ($26.5\pm 2.8\text{kg/m}^3$) fue ligeramente inferior al registrado por Cooley *et al.* en población irlandesa en 2012 que fue de 27.8kg/m^3 , aunque el rango de casos se situó entre 15.6 y 38.7kg/m^3 (168). En población China, el IP ha aumentado en las últimas décadas, situándose alrededor de 26.0kg/m^3 hacia el año 2005 (243) y, en Australia, los resultados son similares para el mismo año, con una tendencia a mayores valores para las niñas en comparación con los niños (244). Esta tendencia diferencial entre sexos también se presentó en un estudio en Dinamarca (245), sin embargo nosotros no la hemos observado en la cohorte analizada (Tabla 4.2). El IP normal al nacimiento se define como el que resulta entre los límites del percentil 10 y 90 de la distribución para la misma población estudiada o un estándar previamente definido. Al disponer de un número reducido de individuos optamos por usar los límites propuestos por Lande *et al.* en población Noruega en 2005 (246). Éstos rangos son entre 25.2 y 31.3kg/m^3 para niños y entre 25.2 y 31.8kg/m^3 para niñas. Los resultados obtenidos mostraron 15 neonatos con valores inferiores a 25.2kg/m^3 y ninguno sobrepasó los límites superiores. Cabe decir que el promedio del IP normal para la población noruega (28.3kg/m^3) es casi 2 puntos superior del obtenido en la población estudiada, lo cual podría estar infravalorando los casos de IP altos. En definitiva, obtuvimos unos resultados para el IP al nacer dentro de los rangos presentados por otros estudios y en otras poblaciones aunque las diferencias asociadas al sexo no fueron significativas.

Tras el nacimiento, se observaron claras diferencias asociadas al sexo durante la evolución de los parámetros antropométricos para los meses 1, 2, 3, 6, 12, 18 y 24 tras el parto, a excepción del IP, mientras que no hubo diferencias significativas asociadas al IMC materno (Tabla 4.2). Sin embargo, cuando se evaluó el efecto interacción entre el IMC materno y el sexo del lactante se obtuvieron diferencias significativas para los pesos a los 12 ($p=0.029$), 18 meses ($p=0.026$) y 24 meses ($p=0.012$) de edad, el PC a los 12 meses ($p=0.043$), el IMC a los 18 meses ($p=0.013$) y a los 24 meses ($p=0.011$) y el IP a los dos años ($p=0.049$). La Figura 4.1 refleja estas diferencias tras la agrupación de los bebés según su sexo y la obesidad materna.

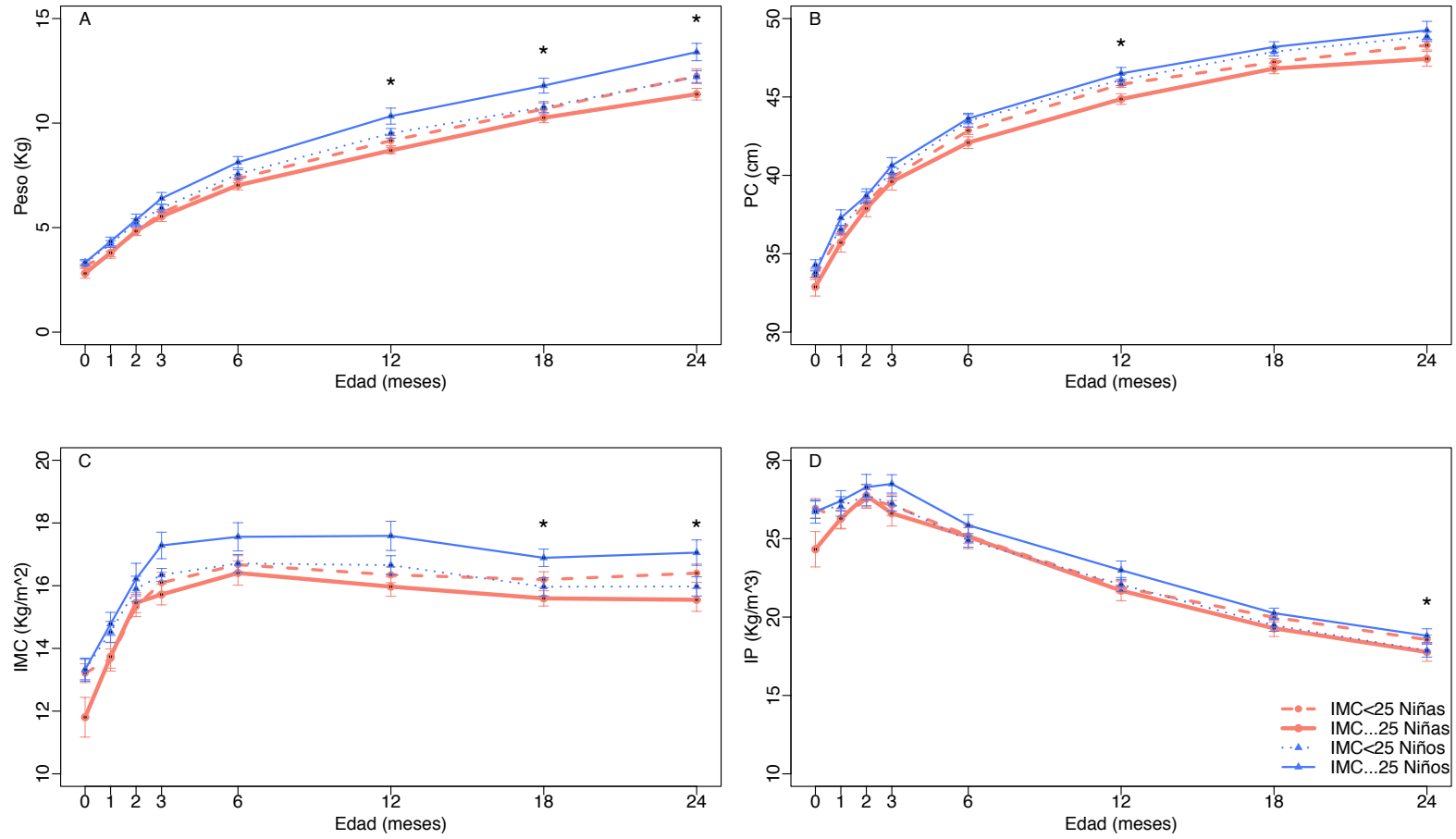


Figura 4.1 Evolución del peso (A), el perímetro craneal (PC) (B), el índice de masa corporal (IMC) (C) y el índice ponderal (IP) (D) de 0 a 2 años de edad en la población infantil de la cohorte caracterizada según el IMC materno (IMC<25 o IMC≥25) y el sexo del lactante (niño o niña). El asterisco simboliza las diferencias significativas como resultado del análisis por ANOVA de dos factores.

Así, a los dos años de edad la población infantil presentó un peso de 12.3 ± 1.5 kg, una talla de 87.6 ± 3.1 cm, un PC de 48.5 ± 1.5 cm, un IMC de 16.0 ± 1.3 kg/m² y un IP de 18.3 ± 1.5 kg/m³ (Tabla 4.2).

A esta edad, el IMC fue de 15.9 ± 1.3 kg/m² para las niñas y 16.2 ± 1.3 kg/m² para los niños, no superando los límites establecidos para la definición de sobrepeso (18.41 kg/m² niños, 18.02 kg/m² niñas) o de obesidad infantil (20.09 kg/m² niños, 19.81 kg/m² niñas) a los dos años de edad (166). Sin embargo, hubo cuatro casos (dos niños y dos niñas) que presentaron sobrepeso a los dos años de edad en base a esta clasificación.

Por tanto, desde el nacimiento y hasta los dos años de edad observamos trayectorias de crecimiento diferenciadas entre sexos en función del IMC materno, así como el diagnóstico de algunos casos de sobrepeso infantil.

Por otro lado, evaluamos la evolución de las variables antropométricas de crecimiento infantil en comparación a los estándares de la OMS mediante el uso de los z-scores calculados para cada mes ensayado. Los resultados más relevantes se presentan en la Figura 4.2.

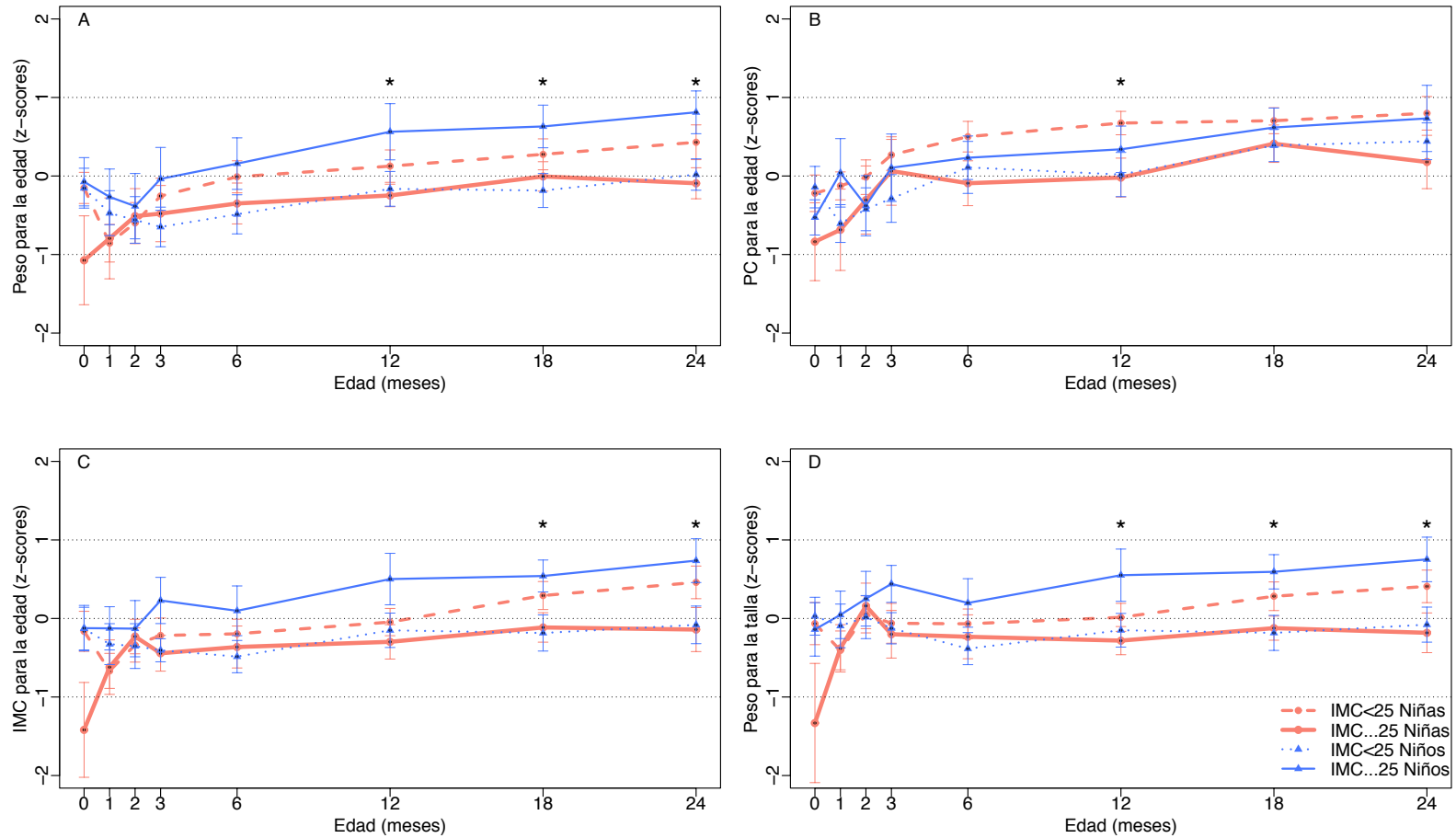


Figura 4.2 Evolución del peso para la edad (z-scores) (A), el perímetro craneal (PC) para la edad (B), el índice de masa corporal (IMC) para la edad (C) y el peso para la talla (D) de 0 a 2 años por grupos de estudio según el IMC materno (IMC<25 o IMC≥25) y el sexo del lactante (niño o niña). El asterisco simboliza las diferencias significativas como resultado del análisis por ANOVA de dos factores.

En dicha figura podemos observar que, en comparación con los estándares de crecimiento de la OMS, la población estudiada presentó un crecimiento situado entre $-1DE < z\text{-scores} > 1DE$ a excepción del peso para la talla y el IMC para la edad del grupo de niñas de madres con sobrepeso u obesidad al nacimiento.

Así mismo, observamos trayectorias de crecimiento con el mismo patrón que para las variables no estandarizadas (Figura 4.1) aunque se magnifican las diferencias entre grupos y el PC estandarizado de las niñas de madres normopeso sobrepasa al resto de grupos (Figura 4.2), a diferencia de lo que se desprende de los datos no estandarizados.

También se puede observar que los z-scores para las variables antropométricas ajustados por sexo y edad fueron inferiores en niños que en niñas de madres con un peso normal (Figura 4.2), efecto que no se presenta para los datos no estandarizados (Figura 4.1).

La velocidad en la ganancia del peso ajustado a la edad y el sexo entre el nacimiento y los 6 meses de edad fue de 0.76 ± 0.63 desviaciones estándar (DE) para la población infantil estudiada (Tabla 4.2). Un 25.4% de la población presentó una velocidad de crecimiento rápida ($z_{\text{wei 6 meses}} - z_{\text{wei nacimiento}} > 0.67DE$) y observamos diferencias asociadas al IMC materno para esta variable ($p=0.031$), con una velocidad más alta para aquellos lactantes de madres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ($1.01 \pm 0.71DE$) en comparación con las de $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ($0.61 \pm 0.54DE$).

La ganancia de peso rápida durante los primeros seis meses de vida se ha relacionado previamente con una mayor predisposición al desarrollo de obesidad en la edad adulta (9, 247, 248). De hecho, de la observación de los z-scores del peso para la talla y el IMC para la edad se identificaron hasta 36 casos (61%) en riesgo de sobrepeso (z_{wfl} y $z_{\text{bmi}} > 1$) para varios o alguno de los meses ensayados, así como cinco casos (8.5%) con sobrepeso infantil (z_{wfl} y $z_{\text{bmi}} > 2$), aunque no se identificó ningún caso de obesidad (z_{wfl} y $z_{\text{bmi}} > 3$).

Las diferencias observadas para los distintos meses en las variables antropométricas y los z-scores calculados a partir de las mismas sugieren trayectorias de crecimiento diferenciadas asociadas a los factores de interés. Por ese motivo aplicamos un modelo longitudinal que nos permitiera evaluar el efecto global de los factores de interés sobre las distintas medidas antropométricas a la vez que evaluar los factores de confusión que podrían explicar en parte o conjuntamente el crecimiento infantil.

Así, observamos que los factores de interés, el IMC materno y el sexo del lactante, presentaron un efecto de interacción significativo ($p < 0.05$) para todas las variables antropométricas que caracterizan el crecimiento infantil en la población estudiada desde su nacimiento hasta los dos años de edad a excepción de la talla (Tabla 4.3).

Crecimiento infantil de 0 a 2 años	Modelo Lineal Mixto para los factores de interés			
	IMC materno	Sexo	Interacción	AIC
Peso corporal (kg)	0.020	0.028	0.000	1321.84
Talla (cm)	0.344	0.002	0.054	2337.06
Perímetro craneal (cm)	0.001	0.003	0.001	1597.63
IMC (kg/m ²)	0.014	0.207	0.000	1621.86
IP (kg/m ³)	0.064	0.929	0.003	2106.57
z-scores Peso (zwei)	0.001	0.001	0.000	1399.79
z-scores Talla (zlen)	0.123	0.080	0.069	1546.42
z-scores Perímetro craneal (zhc)	0.000	0.000	0.001	1364.39
z-scores IMC (zbmi)	0.000	0.000	0.000	1320.80
z-scores Peso para la Talla (zwfl)	0.001	0.001	0.000	1328.81

Tabla 4.3 Resultados de la explicación debida al sexo del lactante y el IMC materno sobre el crecimiento infantil de 0 a 2 años de edad para distintas variables antropométricas y sus z-scores ajustados por edad y sexo mediante el uso de modelos lineales mixtos para medidas repetidas sin equidad en los espacios temporales. Se trata de los valores para el estadístico p y el criterio de información de Akaike (AIC) los parámetros que nos indican la existencia de un efecto de ambos factores sobre el crecimiento infantil además de la interacción entre ambos. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Al observar los efectos independientes podemos ver que el IMC materno influye especialmente en las variables relacionadas con el peso infantil (peso, IMC, zwei, zbmi, zwfl) y también sobre el PC (PC, zhc), mientras que el sexo del lactante una vez ajustadas las variables mediante los z-scores, presentó un efecto significativo sobre el perímetro cefálico ($p < 0.001$). Estos resultados nos indican trayectorias de crecimiento diferenciadas entre sexos asociadas al IMC materno, con una trayectoria similar entre niñas y niños de madres con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ pero con trayectorias opuestas entre niñas y niños de madres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (Figuras 4.1 y 4.2).

Además, el modelo lineal mixto desveló que el peso y los z-scores para el IMC en la población estudiada son las variables del crecimiento infantil mejor explicadas por el sexo y el IMC materno (AIC más bajos) (Tabla 4.3).

Por último, tras ajustar por las variables de confusión, la interacción entre el sexo y el IMC materno se mantuvo significativa. Si bien, la edad gestacional, ser o no primípara y la estacionalidad del nacimiento mejoraron el modelo de crecimiento infantil, por lo que todos estos factores explicaron de forma significativa el peso de 0 a 2 años de edad y el IMC estandarizado y ajustado a la edad.

En definitiva, la población infantil estudiada creció diferente según el estado de obesidad materno y el sexo. En madres con $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$, los niños presentaron valores superiores y las niñas inferiores en relación a los de madres normopeso ($IMC < 25 \text{kg/m}^2$). Esta diferencia en la trayectoria del crecimiento infantil fue significativa especialmente sobre el peso corporal de 0 a 2 años que además estuvo modulado por la edad gestacional, ser o no primípara y la estación del nacimiento.

Esto nos indica que en la población estudiada, el crecimiento infantil vino explicado por estas variables. Mientras que el IMC, el sexo, la edad gestacional y el ser o no primípara tienen una relación con el crecimiento infantil que ya ha sido documentada y que hemos ido detallando a lo largo de los resultados, la influencia de la estación del parto es algo inesperado y que podría estar relacionado indirectamente con el estatus de vitamina D y calcio.

4.2 Valoración de la ingesta de alimentos y el estatus nutricional materno

4.2.1 Distribución de la ingesta energética y adherencia a la dieta mediterránea

El promedio para la ingesta de energía en la población de estudio fue de $2153 \pm 538 \text{kcal}$ (Tabla 4.4), inferior a la ingesta recomendada para mujeres lactantes según los valores de referencia para la población española que se sitúan en $2685\text{-}2800 \text{kcal}$ para mujeres entre 20 y 49 años (182). Sin embargo este valor de referencia dista de los valores estimados por el IoM (249) y la EFSA (250) para mujeres sedentarias de unos 30 años de edad y con un $IMC < 25 \text{kg/m}^2$ situados en las 2300kcal/día .

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
Energía (kcal)	2153 (538)	2140 (448)	2176 (683)	0.832	2124 (430)	2185 (643)	0.673	2203 (382)	1932 (501)	2055 (526)	2359 (762)	0.054
Proteínas (%)	16.4 (3.00)	16.4 (3.15)	16.3 (2.77)	0.829	16.2 (2.42)	16.6 (3.57)	0.67	16.0 (2.64)	16.8 (1.78)	17.1 (3.74)	15.9 (3.36)	0.245
Carbohidratos (%)	39.8 (5.62)	40.7 (5.32)	38.1 (5.86)	0.092	39.4 (4.78)	40.2 (6.49)	0.633	41.1 (4.23)	35.4 (3.67)	40.3 (6.66)	40.0 (6.54)	0.076
Azúcares (%)	16.5 (4.42)	17.6 (4.01)	14.4 (4.45)	0.009	15.9 (4.42)	17.2 (4.39)	0.269	17.2 (4.16)	12.7 (3.51)	18.3 (3.82)	15.7 (4.81)	0.431
Lípidos (%)	43.9 (5.71)	42.8 (5.26)	45.7 (6.14)	0.082	44.4 (4.68)	43.3 (6.70)	0.486	43.0 (4.61)	47.8 (2.80)	42.7 (6.21)	44.1 (7.52)	0.270
AGS (%)	13.8 (2.57)	13.6 (2.64)	14.0 (2.48)	0.529	14.0 (2.28)	13.5 (2.89)	0.542	13.6 (2.49)	14.8 (1.48)	13.6 (2.92)	13.5 (2.97)	0.409
AGMI (%)	19.9 (3.98)	19.0 (3.83)	21.4 (3.85)	0.023	19.9 (3.12)	19.8 (4.82)	0.867	19.0 (2.81)	22.2 (2.77)	18.9 (5.02)	20.9 (4.53)	0.551
AGPI (%)	6.54 (1.72)	6.55 (1.91)	6.51 (1.36)	0.925	6.75 (1.90)	6.30 (1.49)	0.323	6.67 (2.07)	6.93 (1.50)	6.39 (1.71)	6.19 (1.22)	0.634
Omega 6 (%)	1.76 (1.06)	1.55 (1.04)	2.13 (1.02)	0.044	1.70 (1.07)	1.82 (1.07)	0.651	1.54 (1.07)	2.07 (1.01)	1.56 (1.02)	2.17 (1.07)	0.880
Omega 3 (%)	0.14 (0.09)	0.13 (0.09)	0.17 (0.06)	0.029	0.14 (0.10)	0.15 (0.07)	0.76	0.13 (0.11)	0.17 (0.06)	0.12 (0.06)	0.18 (0.07)	0.720
Agua (g)	2615 (847)	2535 (680)	2760 (1090)	0.398	2603 (812)	2628 (898)	0.914	2640 (738)	2514 (1016)	2390 (585)	2944 (1150)	0.150
Etanol (g)	0.18 (0.50)	0.25 (0.60)	0.04 (0.19)	0.051	0.14 (0.36)	0.22 (0.62)	0.517	0.19 (0.42)	0.00 (0.00)	0.34 (0.79)	0.07 (0.25)	0.787

Tabla 4.4 Valoración de la ingesta diaria de energía y su distribución relativa en macronutrientes (%), ingesta de agua y alcohol (g/día). Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Omega 6 y Omega 3 incluyen todos los ácidos grasos de éstos tipos disponibles en la base de datos de composición de alimentos contenida en el software utilizado y que no coinciden necesariamente con el sumatorio de LA + AA y ALA + EPA + DHA respectivamente. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

El resultado fue similar a la ingesta estimada para la población española de mujeres entre 25 y 44 años de edad en situación fisiológica normal (2060 ± 645 kcal/día) (184). En mujeres lactantes españolas, la ingesta de energía se ha estimado en algunos estudios en 2200 ± 448 kcal/día (Reus, 2004) (251) o 2808 ± 774 kcal/día (Canarias, 2009) (252), mientras que en un estudio realizado en Badajoz se observaron ingestas de 2043 ± 458 kcal/día asociado a una restricción calórica en la población estudiada (253).

Así, observamos niveles de ingesta calórica semejantes entre mujeres lactantes y no lactantes y consecuentemente para otros nutrientes. Sin embargo, cabe considerar que las ingestas recomendadas de energía y nutrientes actuales para la población española se refieren a personas con un índice de actividad ligera y han sido recientemente propuestas para una nueva evaluación en profundidad y de mayor rigor científico que se ajuste mejor a la realidad actual del consumo de alimentos y los nuevos hábitos adquiridos en las últimas décadas (1). Con ello, debe tenerse en cuenta la dudosa idoneidad de las ingestas de referencia actuales en la interpretación de los resultados en la valoración nutricional en curso.

El porcentaje de contribución al total calórico que supuso la ingesta de carbohidratos ($39.8\pm 5.6\%$) se situó por debajo de las recomendaciones (50-60%), al contrario de lo que ocurrió para la ingesta de lípidos que superaron el 30-35% del total de la ingesta calórica con un $43.9\pm 5.7\%$. Por su parte, la contribución de la ingesta proteica ($16.4\pm 3.0\%$) solo superó ligeramente las recomendaciones (10-15%) (184).

La calidad de la energía de la dieta en la población española descrita recientemente como resultado de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE), supera las ingestas recomendadas y los objetivos nutricionales con respecto a la distribución calórica para las proteínas (18%) y las grasas totales (42%), siendo menor de la recomendada para los hidratos de carbono (40%) (184). Este patrón también se refleja en la población estudiada. Sin embargo, al comparar la distribución calórica estimada en la población estudiada con las ingestas observadas en mujeres españolas entre 25 y 44 años (184), encontramos una ingesta inferior de proteínas pero superior de grasa y carbohidratos que las mujeres españolas de la misma franja de edad.

En la población estudiada, la contribución al total calórico debido a la ingesta de azúcares fue del $16.5\pm 4.4\%$, lo cual supera el 10% recomendado para la población española pero coincide con el límite inferior de las ingestas observadas por la EFSA en población europea. Ésta organización emitió una opinión científica según la cual los datos hasta la fecha son insuficientes para fijar una ingesta adecuada o rango de referencia para la ingesta de este grupo de nutrientes (254). Recientemente la OMS ha emitido una directriz diferenciando la ingesta de azúcares libres de los intrínsecos presentes por naturaleza en frutas y verduras frescas. Concretamente recomienda una ingesta inferior al 10% de azúcares libres como monosacáridos

y disacáridos añadidos a los alimentos por los fabricantes, cocineros, propios consumidores, así como los presentes en la miel, jarabes, jugos de fruta y concentrados de jugos de fruta (255).

Teniendo esto en cuenta, observamos que la ingesta de azúcares sencillos totales se debió mayoritariamente al consumo de frutas y lácteos con una contribución también importante de los cereales, vegetales y legumbres, por lo que tan solo un 4.2% fue atribuido a la ingesta de azúcares añadidos (no se muestran estos resultados) a diferencia del 20% descrito para población española debido a la ingesta de azúcar, chocolate y derivados, bebidas no lácteas, aperitivos, salsas y alimentos pre-cocinados (184).

Las proporciones del total calórico para los AGS y AGPI se situaron por encima de los valores recomendados, $13.8 \pm 2.6\%$ y $6.5 \pm 1.7\%$ respectivamente, frente al 7-8% y 5% que se proponen en los Objetivos Nutricionales para la población española (184) mientras que la proporción de AGMI se ajustó a los objetivos con un $19.9 \pm 4.0\%$ frente al 20% recomendado.

Los principales grupos de alimentos que contribuyeron al aporte energético en la población estudiada fueron los cereales y derivados ($25.5 \pm 7.3\%$), seguidos de los aceites y otras grasas ($15.5 \pm 6.1\%$), los cárnicos ($14.4 \pm 8.7\%$) y los lácteos ($13.8 \pm 6.5\%$) (Figura 4.3 y Tabla 4.5). Este perfil es sustancialmente diferente del observado para población española según el cual los cárnicos, legumbres y frutos secos, cereales, aceites y grasas en orden decreciente fueron los cuatro grupos de mayor contribución a la ingesta energética total, mientras que las verduras y hortalizas obtuvieron el porcentaje más bajo. Además, encontramos un consumo mayor de lácteos, frutas (incluyendo los frutos secos) y verduras en detrimento de las legumbres, el pescado y los huevos respecto de los datos para la población española (184).

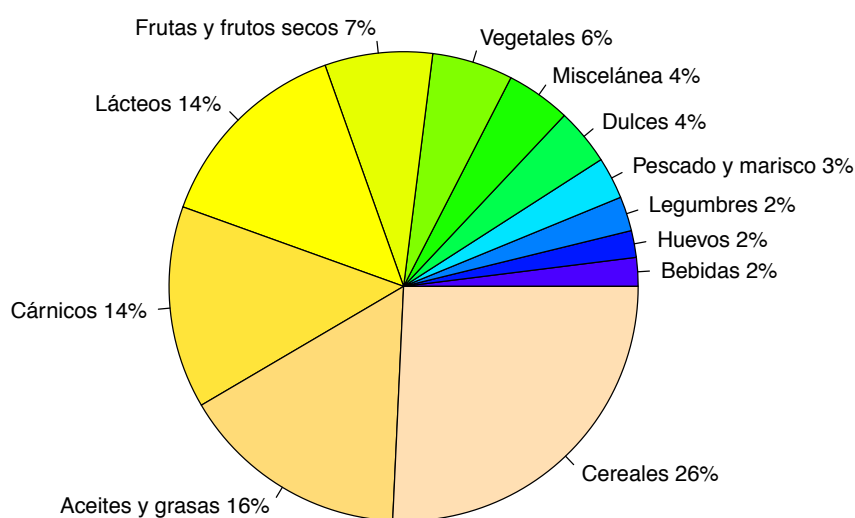


Figura 4.3. Distribución de la ingesta calórica diaria por grupos de alimentos en la cohorte materna durante los primeros tres meses de lactancia (promedio).

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(%)	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
Cereales	25.5 (7.31)	25.3 (8.10)	26.0 (5.78)	0.729	26.2 (7.06)	24.8 (7.64)	0.475	26.6 (7.94)	25.3 (4.48)	23.6 (8.24)	26.4 (6.74)	0.314
Aceites y grasas	15.5 (6.06)	14.4 (5.68)	17.6 (6.33)	0.066	15.6 (5.05)	15.4 (7.11)	0.898	14.5 (4.46)	18.5 (5.49)	14.4 (7.20)	16.9 (7.04)	0.637
Cárnicos	14.4 (8.66)	14.1 (9.17)	15.0 (7.81)	0.680	14.4 (7.68)	14.4 (9.77)	0.977	12.5 (6.69)	19.1 (8.32)	16.2 (11.7)	11.9 (6.07)	0.024
Lácteos	13.8 (6.54)	14.5 (7.17)	12.6 (5.15)	0.252	12.5 (6.21)	15.4 (6.67)	0.090	13.2 (6.22)	10.7 (6.18)	16.3 (8.17)	14.1 (3.88)	0.942
Frutas y frutos secos	7.36 (5.79)	8.19 (6.71)	5.84 (3.18)	0.074	7.61 (4.62)	7.07 (6.94)	0.729	8.33 (4.78)	5.87 (3.89)	8.01 (8.89)	5.82 (2.71)	0.936
Vegetales	5.79 (2.49)	6.21 (2.56)	5.02 (2.20)	0.068	6.11 (2.22)	5.42 (2.74)	0.295	6.12 (2.35)	6.09 (2.02)	6.32 (2.90)	4.22 (2.06)	0.124
Miscelánea	4.32 (5.16)	3.37 (4.08)	6.06 (6.45)	0.094	4.64 (4.73)	3.97 (5.67)	0.623	4.27 (4.16)	5.57 (6.08)	2.13 (3.73)	6.42 (6.96)	0.287
Dulces y azúcares	3.83 (3.48)	4.35 (3.64)	2.89 (3.02)	0.107	3.73 (3.39)	3.94 (3.63)	0.816	4.55 (3.66)	1.72 (1.22)	4.07 (3.71)	3.78 (3.68)	0.183
Pescados y mariscos	3.06 (2.94)	2.92 (2.54)	3.30 (3.62)	0.673	2.86 (2.55)	3.27 (3.36)	0.602	2.90 (2.63)	2.77 (2.51)	2.95 (2.50)	3.70 (4.34)	0.599
Legumbres	2.44 (3.01)	2.48 (2.85)	2.37 (3.36)	0.892	2.86 (3.10)	1.98 (2.90)	0.269	3.11 (2.96)	2.23 (3.51)	1.62 (2.52)	2.47 (3.40)	0.303
Bebidas	2.01 (2.46)	2.38 (2.72)	1.34 (1.79)	0.082	1.71 (2.02)	2.34 (2.87)	0.339	1.97 (2.21)	1.08 (1.40)	2.94 (3.28)	1.53 (2.08)	0.698
Huevos	1.86 (1.83)	1.77 (1.46)	2.01 (2.39)	0.684	1.71 (1.42)	2.02 (2.21)	0.533	1.98 (1.48)	1.04 (1.06)	1.48 (1.43)	2.73 (2.87)	0.030

Tabla 4.5 Distribución del aporte total calórico por grupos de alimentos. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Miscelánea comprende la suma de calorías ingeridas de Precocinados + Aperitivos + Salsas + Productos dietéticos; el término Bebidas, comprende todas las bebidas, distintas del agua, incluidas las alcohólicas. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

En relación al consumo de líquidos con la dieta, la ingesta de agua total procedente de los alimentos y bebidas fue de 2615 ± 847 g/día, aproximadamente 2.6L/día en promedio, lo cual se ajusta a las ingestas adecuadas estimadas por la EFSA para las mujeres durante la etapa de lactancia (2.7L/día) (256) (Tabla 4.4).

El consumo de alcohol estuvo presente en un 20.3% de las mujeres lactantes lo cual resultó en una ingesta promedio de 0.18 ± 0.50 g/día, aun estando desaconsejado su consumo durante la lactancia materna (189). Este dato es muy bajo en comparación con el máximo aceptable para mujeres no lactantes (<20 g/día), pero en algunos casos se alcanzaron los 2g/día de etanol ingeridos lo que podría suponer un riesgo para el lactante.

Por último observamos una adherencia intermedia al patrón de dieta mediterránea tal y como se ha descrito para la población de las Islas Baleares previamente aunque usando una metodología distinta (257). La mediana para el índice de adherencia a la dieta mediterránea MDS1 resultó igual al descrito para la población española (MDS1=4) (258), mientras que el MDS2 presentó una mediana ligeramente superior (MDS2=5). La distribución fue del 37.3% de la población con baja adherencia al patrón de alimentación mediterráneo tradicional (MDS2 $<$ 4), un 49.2% presentó una adherencia intermedia ($4 < \text{MDS2} < 6$) y solo el 13.6% obtuvo una alta adherencia al patrón de dieta mediterráneo (MDS2 $>$ 6). Así, el porcentaje de la población con adherencias intermedias y altas (MDS2, 62.8%) fue superior al descrito para mujeres españolas (MDS2, 38.0%).

Cuando se consideró el MDS1, que no tiene en cuenta la ingesta de pescado, la distribución en adherencia baja se incrementó (54.2%), lo que indica un consumo elevado de pescado y marisco en la población estudiada. Este efecto que resuelve resultados superiores para el MDS2 respecto del MDS1 se ha descrito previamente en poblaciones que viven en zonas costeras y que por tanto tienen una ingesta de pescado más frecuente y extendida (259).

Cabe recordar que a diferencia de los resultados para la población española, en este estudio el consumo de alcohol por parte de las mujeres lactantes fue puntuado con 1 punto cuando no consumieron alcohol y 0 puntos si consumieron alcohol durante la lactancia, de acuerdo a la consideración desfavorable del consumo de alcohol durante esta etapa de la vida, contrariamente al concepto actual de considerar saludable un consumo moderado de alcohol para la población general (<20 g/día en mujeres).

4.2.2 Ingesta de macronutrientes y calidad de la dieta

4.2.2.1 Ingesta de proteínas y aminoácidos

La ingesta promedio de proteínas en la población estudiada fue de 86.2 ± 18.6 g/día (Tabla 4.6). Durante los primeros seis meses de lactancia exclusiva se recomienda una ingesta de 19g adicionales a los 0.83g/kg/día fijados para mujeres no lactantes por la EFSA (260). Partiendo de un peso corporal promedio de 63.2kg, la ingesta recomendada sería de 71.45g/día, exactamente la ingesta recomendada por el IoM para esta etapa fisiológica (249). Para la población española se ha establecido un aporte diario de 41g/día para las mujeres adultas y en el caso de estar en la etapa de lactancia deben añadirse 25g/día adicionales. De esta manera quedaría en 66g/día. En todos los casos, la ingesta observada superó las recomendaciones, al igual que ocurre en la población española y en las estimaciones europeas. Además, el 15.3% de la población superó el doble de las ingestas de referencia marcado como límite de seguridad por la EFSA. Por el contrario, un 13.6% de la población estudiada no alcanzó las recomendaciones ni los requerimientos medios estimados (EARs) para mujeres lactantes del IoM (1.05g/kg/día), lo cual manifiesta que una pequeña parte de la población estudiada presentó una ingesta inadecuada de proteínas para su estado fisiológico.

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(g/día)	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
Proteínas totales	86.2 (18.6)	86.3 (16.5)	86.1 (22.4)	0.969	84.9 (15.6)	87.7 (21.7)	0.571	86.7 (13.7)	80.5 (19.8)	85.8 (20.2)	90.3 (24.1)	0.307
AaT	65.3 (18.0)	63.9 (16.7)	67.9 (20.1)	0.446	63.8 (14.1)	67.0 (21.6)	0.513	63.4 (13.0)	65.0 (17.2)	64.7 (21.3)	70.1 (22.6)	0.708
AaE	26.2 (7.05)	25.7 (6.86)	27.1 (7.46)	0.478	25.6 (5.73)	26.8 (8.33)	0.514	25.3 (5.36)	26.2 (6.87)	26.1 (8.68)	27.7 (8.11)	0.859
Histidina	1.75 (0.47)	1.73 (0.48)	1.80 (0.45)	0.552	1.74 (0.39)	1.77 (0.54)	0.847	1.72 (0.39)	1.80 (0.41)	1.74 (0.59)	1.80 (0.50)	0.922
Treonina	2.66 (0.73)	2.60 (0.71)	2.76 (0.77)	0.440	2.57 (0.58)	2.76 (0.87)	0.326	2.54 (0.55)	2.62 (0.69)	2.68 (0.90)	2.86 (0.85)	0.795
Valina	3.57 (0.94)	3.51 (0.89)	3.67 (1.03)	0.553	3.49 (0.77)	3.66 (1.10)	0.502	3.47 (0.73)	3.52 (0.93)	3.56 (1.10)	3.78 (1.13)	0.735
Metionina	1.51 (0.44)	1.47 (0.42)	1.58 (0.47)	0.377	1.47 (0.35)	1.55 (0.53)	0.498	1.44 (0.31)	1.55 (0.42)	1.51 (0.55)	1.60 (0.52)	0.945
Triptofano	0.85 (0.21)	0.84 (0.18)	0.86 (0.26)	0.718	0.84 (0.16)	0.86 (0.25)	0.707	0.85 (0.13)	0.81 (0.24)	0.83 (0.23)	0.90 (0.29)	0.381
Fenilalanina	2.90 (0.75)	2.85 (0.71)	2.98 (0.85)	0.553	2.85 (0.62)	2.95 (0.89)	0.608	2.86 (0.58)	2.83 (0.77)	2.84 (0.88)	3.10 (0.92)	0.506
Isoleucina	3.21 (0.89)	3.15 (0.88)	3.32 (0.92)	0.477	3.12 (0.71)	3.31 (1.05)	0.430	3.09 (0.65)	3.21 (0.89)	3.23 (1.14)	3.41 (0.96)	0.905
Leucina	5.13 (1.40)	5.03 (1.33)	5.32 (1.53)	0.477	5.01 (1.18)	5.27 (1.62)	0.499	4.99 (1.09)	5.08 (1.43)	5.10 (1.64)	5.49 (1.63)	0.700
Lisina	4.60 (1.38)	4.50 (1.41)	4.79 (1.33)	0.434	4.51 (1.14)	4.71 (1.61)	0.582	4.38 (1.12)	4.80 (1.22)	4.65 (1.77)	4.78 (1.46)	0.712
AaSE	6.92 (1.94)	6.74 (1.80)	7.23 (2.16)	0.388	6.80 (1.54)	7.05 (2.32)	0.637	6.73 (1.37)	6.97 (1.97)	6.76 (2.32)	7.43 (2.36)	0.698
Arginina	3.66 (1.11)	3.58 (1.06)	3.81 (1.20)	0.461	3.61 (0.88)	3.72 (1.34)	0.723	3.57 (0.84)	3.70 (1.02)	3.58 (1.34)	3.89 (1.36)	0.780
Tirosina	2.33 (0.61)	2.29 (0.59)	2.41 (0.66)	0.492	2.29 (0.52)	2.38 (0.70)	0.574	2.27 (0.48)	2.34 (0.64)	2.32 (0.72)	2.46 (0.70)	0.846
Cisteína	0.93 (0.31)	0.88 (0.21)	1.01 (0.44)	0.207	0.90 (0.24)	0.95 (0.39)	0.570	0.89 (0.14)	0.93 (0.39)	0.86 (0.28)	1.07 (0.48)	0.298

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(g/día)	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
AaNE	32.3 (9.17)	31.5 (8.17)	33.6 (10.8)	0.449	31.5 (6.92)	33.1 (11.2)	0.498	31.3 (6.42)	31.8 (8.45)	31.8 (10.3)	34.9 (12.5)	0.606
Alanina	3.27 (1.09)	3.17 (1.05)	3.46 (1.15)	0.356	3.19 (0.80)	3.36 (1.34)	0.557	3.11 (0.78)	3.40 (0.88)	3.27 (1.37)	3.50 (1.35)	0.917
Aspártico	5.94 (1.68)	5.89 (1.73)	6.05 (1.64)	0.717	5.86 (1.41)	6.04 (1.96)	0.700	5.82 (1.37)	5.97 (1.58)	5.98 (2.17)	6.12 (1.75)	0.994
Glicina	3.06 (1.25)	2.93 (1.00)	3.29 (1.60)	0.347	2.92 (0.76)	3.21 (1.63)	0.394	2.86 (0.76)	3.07 (0.79)	3.02 (1.28)	3.46 (2.03)	0.755
Glutámico	12.5 (3.43)	12.3 (3.00)	12.9 (4.16)	0.578	12.3 (2.74)	12.8 (4.09)	0.575	12.3 (2.42)	12.2 (3.59)	12.4 (3.73)	13.4 (4.63)	0.555
Prolina	4.19 (1.33)	4.06 (1.02)	4.43 (1.77)	0.391	4.07 (1.02)	4.32 (1.62)	0.484	4.09 (0.94)	4.04 (1.25)	4.03 (1.16)	4.72 (2.08)	0.318
Serina	3.15 (0.84)	3.08 (0.74)	3.28 (1.01)	0.425	3.06 (0.68)	3.24 (0.99)	0.432	3.07 (0.61)	3.05 (0.88)	3.09 (0.90)	3.45 (1.11)	0.417
Hidroxiprolina	0.09 (0.38)	0.05 (0.08)	0.16 (0.62)	0.404	0.04 (0.08)	0.14 (0.54)	0.358	0.05 (0.09)	0.03 (0.07)	0.04 (0.08)	0.27 (0.82)	0.246
AaLN	19.0 (5.13)	18.7 (4.98)	19.7 (5.44)	0.479	18.6 (4.23)	19.5 (6.02)	0.531	18.4 (3.92)	19.1 (5.15)	19.0 (6.28)	20.1 (5.84)	0.855
Trp/AaLN	0.05 (0.01)	0.05 (0.01)	0.05 (0.01)	0.320	0.05 (0.01)	0.05 (0.01)	0.988	0.05 (0.01)	0.04 (0.00)	0.05 (0.02)	0.05 (0.01)	0.471

Tabla 4.6 Valoración de la ingesta de proteínas y aminoácidos procedentes de los alimentos (g/día), así como el ratio triptófano en relación a los aminoácidos neutros de cadena larga (AaLN). Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. AaT, aminoácidos totales; AaE, aminoácidos esenciales; AaSE, aminoácidos semi-esenciales; AaNE, aminoácidos no esenciales. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Desde un punto de vista nutricional, la composición en aminoácidos de las proteínas es un aspecto de especial relevancia. Así, evaluamos la ingesta de aminoácidos totales (AaT) que resultó de 65.3 ± 18.0 g/día, así como las ingestas de los aminoácidos individuales (Tabla 4.6) procedentes de los alimentos (137, 261).

Los aminoácidos esenciales (AaE) que incluyen la histidina, treonina, valina, metionina, triptófano, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina supusieron un aporte total de 26.2 ± 7.1 g/día. Los aminoácidos semi-esenciales (AaSE) sumaron un total de 6.92 ± 1.94 g/día entre la arginina, la tirosina y la cisteína y, finalmente los aminoácidos no esenciales (AaNE) (la alanina, el ácido aspártico, la glicina, el ácido glutámico, la prolina, la serina y la hidroxiprolina) resultaron en un aporte conjunto de 32.3 ± 9.2 g/día. La asparagina, la taurina y la glutamina no se encuentran en la base de datos de composición de alimentos utilizada (172) y por tanto no se ha podido valorar su contribución a partir de los alimentos de la dieta.

En la actualidad no disponemos de valores de referencia en población europea para los aminoácidos ya que la EFSA ha resumido recientemente que los valores para los requerimientos de aminoácidos esenciales hasta la fecha no son suficientemente precisos ya que su aporte nutricional no es a nivel individual sino como parte de las proteínas, lo cual dificulta hallar un indicador adecuado para el cálculo de los valores de referencia (260). Sin embargo, el IoM ha determinado unas recomendaciones de aminoácidos esenciales durante la lactancia en relación al peso corporal. Así, en la población de estudio (63.2kg), las ingestas de aminoácidos esenciales se situaron ligeramente por encima de los valores de ingestas recomendadas, aunque entre un 3.4 y el 22.0% de la población no alcanzó dichas recomendaciones para alguno o varios de los aminoácidos evaluados.

Por último, se evaluó el ratio de la ingesta de triptófano frente al resto de los aminoácidos neutros de cadena larga (Trp/AaLN) cuyo interés recae en su potencial influencia sobre la disponibilidad y utilización de triptófano y su conversión a serotonina a nivel cerebral (262). La ingesta de AaLN fue de 19.0 ± 5.1 g/día y el ratio Trp/AaLN fue de 0.05 ± 0.01 . En la actualidad no disponemos de estudios experimentales en humanos con los que contrastar estos datos, pero el estudio de la ingesta de este tipo de aminoácidos tiene relevancia en el abordaje de la obesidad, motivo por el cual presentamos esta valoración (263, 264).

En definitiva, la ingesta promedio de proteínas y aminoácidos observadas en la población de mujeres durante la etapa de lactancia se pueden considerar adecuadas, si bien una parte excedería las recomendaciones mientras que otra no las alcanzaría.

En la actualidad no se conoce el efecto que la ingesta proteica por parte de la madre pueda tener sobre la composición de la leche ni sobre el crecimiento infantil, aunque es de interés ya que la

concentración proteica distinta de la leche materna frente a la leche artificial sí parece tener un rol importante en la predisposición a la obesidad de la descendencia (144).

4.2.2.2 Ingesta de lípidos, ácidos grasos y colesterol

La ingesta promedio de lípidos totales en la población estudiada fue de 106 ± 34.1 g/día, con una contribución mayoritaria del ácido oleico (44.3 ± 16.6 g/día, el 98% de los AGMI) seguido del palmítico con un aporte de 17.8 ± 6.2 g/día (53.5% de los AGS) (Tabla 4.7).

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(g/día)	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
Lípidos	106 (34.1)	103 (27.6)	112 (43.7)	0.375	105 (25.4)	107 (42.3)	0.847	106 (24.0)	103 (30.1)	98.1 (32.2)	119 (52.0)	0.226
AGS	33.3 (11.6)	32.6 (9.86)	34.7 (14.3)	0.544	33.4 (9.85)	33.3 (13.4)	0.970	33.8 (9.74)	32.2 (10.6)	30.8 (10.1)	36.6 (16.8)	0.254
Mirístico	2.68 (1.28)	2.66 (1.19)	2.73 (1.44)	0.860	2.74 (1.33)	2.62 (1.24)	0.711	2.80 (1.35)	2.61 (1.35)	2.47 (0.96)	2.82 (1.56)	0.458
Palmitico	17.8 (6.23)	17.3 (5.50)	18.7 (7.42)	0.449	17.7 (5.19)	17.9 (7.30)	0.915	17.9 (5.48)	17.3 (4.69)	16.5 (5.61)	19.8 (9.02)	0.274
Estearico	7.12 (2.63)	7.02 (2.39)	7.30 (3.08)	0.726	6.96 (2.11)	7.29 (3.15)	0.640	7.07 (2.27)	6.70 (1.72)	6.96 (2.62)	7.74 (3.82)	0.438
AGMI	48.0 (17.7)	45.4 (13.9)	52.8 (22.6)	0.183	46.9 (11.3)	49.2 (22.9)	0.627	46.6 (10.8)	47.4 (13.2)	43.6 (17.6)	56.7 (27.6)	0.204
Palmitoleico	1.67 (0.60)	1.63 (0.55)	1.73 (0.67)	0.560	1.64 (0.55)	1.69 (0.65)	0.765	1.61 (0.56)	1.73 (0.52)	1.66 (0.56)	1.73 (0.79)	0.857
Oleico	44.3 (16.6)	41.8 (13.2)	48.9 (21.1)	0.171	43.0 (10.6)	45.8 (21.5)	0.546	42.7 (10.1)	44.0 (12.5)	40.6 (16.9)	52.6 (25.6)	0.241
AGPI	15.8 (6.32)	15.9 (6.74)	15.7 (5.64)	0.910	16.1 (6.34)	15.4 (6.39)	0.662	16.5 (6.48)	15.3 (6.28)	15.0 (7.20)	15.9 (5.39)	0.558
LA	12.8 (5.38)	12.7 (5.82)	12.9 (4.61)	0.854	12.8 (5.31)	12.7 (5.55)	0.971	12.9 (5.58)	12.4 (4.87)	12.3 (6.29)	13.3 (4.58)	0.615
ALA	1.50 (0.77)	1.54 (0.84)	1.43 (0.63)	0.571	1.52 (0.77)	1.48 (0.78)	0.839	1.55 (0.80)	1.44 (0.71)	1.52 (0.92)	1.42 (0.59)	0.988
AA	0.18 (0.16)	0.18 (0.18)	0.17 (0.09)	0.881	0.17 (0.10)	0.19 (0.20)	0.620	0.15 (0.11)	0.22 (0.08)	0.22 (0.25)	0.14 (0.08)	0.079
EPA	0.11 (0.19)	0.13 (0.22)	0.07 (0.13)	0.222	0.13 (0.23)	0.09 (0.14)	0.438	0.13 (0.25)	0.13 (0.19)	0.14 (0.17)	0.03 (0.03)	0.302
DPA	0.04 (0.04)	0.04 (0.04)	0.05 (0.05)	0.604	0.04 (0.04)	0.05 (0.04)	0.455	0.03 (0.04)	0.06 (0.05)	0.05 (0.04)	0.04 (0.05)	0.152
DHA	0.23 (0.27)	0.25 (0.28)	0.20 (0.27)	0.499	0.25 (0.33)	0.21 (0.19)	0.531	0.23 (0.31)	0.31 (0.39)	0.28 (0.22)	0.12 (0.09)	0.132
Colesterol (mg/día)	342 (120)	330 (98.9)	364 (151)	0.369	335 (104)	350 (136)	0.621	342 (102)	318 (114)	315 (95.5)	398 (170)	0.106

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(g/día)	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
AGPI/AGS	0.50 (0.19)	0.51 (0.23)	0.47 (0.11)	0.376	0.50 (0.20)	0.49 (0.19)	0.856	0.52 (0.23)	0.47 (0.07)	0.51 (0.23)	0.48 (0.13)	0.856
AGPI+AGMI/AGS	1.99 (0.53)	1.97 (0.61)	2.03 (0.34)	0.617	1.97 (0.44)	2.01 (0.62)	0.766	1.96 (0.50)	2.00 (0.26)	1.98 (0.76)	2.05 (0.40)	0.907
Omega6/Omega3	7.58 (2.37)	7.24 (2.42)	8.20 (2.22)	0.130	7.34 (1.90)	7.85 (2.82)	0.426	7.37 (2.06)	7.27 (1.54)	7.06 (2.89)	8.90 (2.45)	0.137
LA/ALA	9.09 (2.54)	8.82 (2.50)	9.59 (2.59)	0.274	8.84 (1.98)	9.37 (3.06)	0.445	8.80 (1.93)	8.96 (2.20)	8.85 (3.20)	10.1 (2.84)	0.457

Tabla 4.7. Ingesta de lípidos, ácidos grasos y colesterol (g/día), así como los ratios de ingesta de AGPI/AGS, (AGPI+AGMI)/AGS y Omega6/Omega3. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. AGS, Ácidos grasos saturados; AGMI, Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, Ácidos grasos poliinsaturados; LA, Ácido linoleico; ALA, Ácido linolénico; AA, Ácido araquidónico; EPA, Ácido eicosapentaenoico; DPA, Ácido docosapentaenoico; DHA, Ácido docosahexaenoico, Omega 6, suma de LA + AA; Omega 3, suma de ALA + EPA + DHA. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Se valoró la calidad de la ingesta de grasa a partir de las ingestas de colesterol, ácidos grasos esenciales y los ratios AGPI/AGS, (AGPI+AGMI)/AGS, Omega 6/Omega 3 y el ratio para la ingesta de ácido linoleico (LA) frente a la de ácido alfa-linolénico (ALA).

La ingesta de colesterol en la población de estudio fue de 342 ± 120 mg/día. Actualmente no existen recomendaciones para la ingesta de este nutriente en la población general ni tampoco se ha estipulado una demanda superior durante la lactancia, pero se recomienda que la ingesta no exceda los 300 mg/día en adultos. De acuerdo a este límite, tan solo un 36.6% de la población ingirió niveles inferiores, aunque en comparación con la estimación de la ingesta para la población española con tan solo un 5% respetando dicho valor (184), la población estudiada obtuvo mejores resultados.

La EFSA no ha propuesto unos valores de ingesta de referencia para los distintos tipos de AG ni para el colesterol, recomendando el menor consumo posible de grasa saturada y *trans*, lo cual incluye los alimentos ricos en colesterol (265). Sin embargo, sí ha establecido unas ingestas adecuadas para los ácidos grasos esenciales: linoleico (LA), alfa-linolénico (ALA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA).

En relación a la ingesta de LA, ésta fue de 12.8 ± 5.4 g/día (5.27 ± 1.51 % de la ingesta calórica). El análisis de la EFSA concluye que ingestas del 4% del total energético no se acompañan de efectos perjudiciales por deficiencia en población europea. Para la población española los objetivos nutricionales se sitúan en un rango del 2.5-9% del total calórico y se estiman unas necesidades de 10 g/día (184). Por su parte, las Ingestas Diarias de Referencia (DRI) propuestas por el IoM (266), proponen una ingesta de 12 g/día para mujeres y 13 g/día si están en etapa de lactancia. Así pues, a nivel de la población estudiada podemos considerar que la ingesta de ácido linoleico (LA) fue adecuada. Si bien, un 18.6% de la población no alcanzó el valor del 4% fijado por la EFSA.

La ingesta de ALA fue de 1.50 ± 0.77 g/día, un 0.61 ± 0.22 % del total calórico. Las DRI del IoM proponen un incremento de 1.1 g/día para mujeres adultas a 1.3 g/día si están lactando (249). La EFSA fija una ingesta adecuada en el 0.5% del total calórico (265) y los objetivos para la población española establecen las recomendaciones en 2 g/día y un rango entre el 0.5-1% (184). En base a estas referencias, un 64.4% de la población estudiada cumplió con las ingestas adecuadas de la EFSA y un 18.6% superó los 2 g/día que propone la SENC para la población española.

Siguiendo con los ácidos grasos Omega 3, encontramos recomendaciones de ingesta para el EPA y el DHA, ambos de cadena larga que pueden ser sintetizados a partir de ALA y han demostrado efectos beneficiosos sobre la salud. Las ingestas en la población estudiada fueron de

0.11±0.19g/día de EPA y 0.23±0.27g/día de DHA. Las desviaciones estándar tan amplias son debidas a ingestas muy bajas en la mayoría de la población estudiada, en contraste con ingestas muy altas debido a la suplementación recibida por parte de algunas mujeres durante la lactancia.

La EFSA propone una ingesta adecuada de 250mg/día de EPA y DHA al igual que los objetivos nutricionales para la población española en adultos (184, 265). Sin embargo en situaciones fisiológicas como la lactancia se recomienda incrementar la ingesta de estos AG con 100-200mg más. Así, un 33.9% de la población de estudio superó la ingesta adecuada de 250mg/día con tan solo 15 mujeres superando los 350mg/día y 11 llegaron hasta los 450mg/día recomendados durante la lactancia.

Los ratios AGPI/AGS y (AGPI+AGMI)/AGS de evaluación en las proporciones relativas de los distintos AG en la dieta fueron de 0.5±0.2 y 2±0.5 respectivamente. Ambos coinciden con los límites inferiores planteados por la SENC para la población española (1), aunque la mayor parte de las mujeres del estudio (66.1% y 64.4% respectivamente) no alcanzaron dichos límites, lo cual pone de manifiesto que la calidad de la grasa dietética es adecuada pero aún podría ser mejorable para gran parte de las mujeres.

El ratio Omega 6/Omega 3 alcanzó un valor de 7.58±2.37, con un 5.1% de la población sin llegar a los 4 puntos, un 16.9% superó los 10 puntos y tan solo un 11.9% se situó dentro del rango recomendado para la población española (4:1 - 5:1) (1). Ello pone de manifiesto un desequilibrio asociado a una ingesta mayor de alimentos ricos en Omega 6 (aceite de girasol, soja y maíz, semillas de lino, carnes de cordero y ternera y yema de huevo) por encima de las fuentes de Omega 3 (pescado azul y marisco, aceite de colza, frutos secos) (186). Sin embargo, tanto la EFSA como el IoM no fijan un ratio por falta de suficiente evidencia que apoye la determinación de un valor o rango adecuado (249, 265). Aun así, el IoM hace referencia a las recomendaciones de la OMS de situar el ratio LA/ALA entre 5:1 y 10:1 (249), rango dentro del cual se sitúan los resultados de ingesta de la población estudiada (9.09±2.54) a excepción de un 35.6% que supera el límite superior.

El conjunto de ratios aquí evaluados describen cualitativamente el tipo de lípidos predominantes en la dieta de la población de estudio así como las fuentes alimentarias cuyo interés se debe a su relación con enfermedades metabólicas tales como la obesidad, el síndrome metabólico y los accidentes cardiovasculares que en las últimas décadas han ido *in crescendo* de forma simultánea a un aumento del consumo de grasas saturadas sobre el de monoinsaturadas y poliinsaturadas, así como de las poliinsaturadas Omega 6 sobre las de tipo Omega 3 (267).

De acuerdo a los resultados obtenidos para los cuatro ratios, la población de mujeres durante la etapa de lactancia se sitúa dentro de los límites definidos para una ingesta de grasa de alta

calidad, aunque una parte importante que varía en magnitud dependiendo del ratio (5-90%) no cumpliría los criterios establecidos para cada ratio evaluado. Esta observación pone de manifiesto una alta variabilidad muestral en cuanto al tipo de grasa ingerida en la población estudiada.

Puesto que el tipo de grasa consumido por la madre durante la lactancia influye sobre la composición de su leche (57), situaciones de deficiencia o exceso de determinados AG durante la lactancia parecen un punto vulnerable y de atención tanto en su potencial en la programación temprana de la obesidad como en otros campos de la prevención y la clínica nutricional.

4.2.2.3 Ingesta de carbohidratos y fibra

Desde el punto de vista nutricional, la dieta aporta hidratos de carbono simples o disponibles, que se digieren y absorben en el intestino delgado y por otro lado, la fibra, un grupo de moléculas, mayoritariamente carbohidratos, que son resistentes a la digestión y posterior absorción en el intestino delgado; de modo que alcanzan el intestino grueso donde pueden ser objeto de fermentación anaeróbica por la microflora gastrointestinal.

La ingesta promedio de carbohidratos totales digeribles en la población estudiada fue de 204 ± 59.1 g/día, con una contribución mayoritaria del almidón (111 ± 43.2 g/día) seguido de los azúcares totales con un aporte de 87.9 ± 30.3 g/día que incluyen los mono-, di- y oligosacáridos (Tabla 4.8). Entre ellos, el azúcar más abundante en la dieta fue la sacarosa (26.4 ± 15.4 g/día) seguida de la fructosa (11.4 ± 6.3 g/día), lactosa (10.9 ± 6.2 g/día), glucosa (9.6 ± 4.8 g/día) y por último la maltosa (0.95 ± 1.79 g/día) y la galactosa (0.24 ± 0.65 g/día) que se encuentran en menores proporciones y menos ampliamente distribuidas en los alimentos.

(g/día)	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
Carbohidratos	204 (59.1)	208 (53.7)	196 (68.5)	0.486	200 (49.4)	208 (69.0)	0.601	216 (43.2)	160 (42.4)	197 (65.5)	222 (73.7)	0.013
Almidón	111 (43.2)	107 (34.7)	118 (55.6)	0.422	111 (34.5)	110 (51.7)	0.953	117 (36.4)	97.4 (26.3)	93.4 (28.1)	133 (67.2)	0.012
Azúcares	87.9 (30.3)	94.9 (30.9)	75.4 (25.2)	0.012	85.1 (30.8)	91.1 (30.0)	0.450	94.8 (28.2)	61.3 (23.8)	95.0 (35.3)	86.0 (21.5)	0.124
Glucosa	9.62 (4.75)	10.6 (5.20)	7.80 (3.17)	0.012	9.55 (3.89)	9.70 (5.63)	0.910	10.2 (4.03)	7.99 (3.23)	11.2 (6.59)	7.67 (3.26)	0.600
Fructosa	11.4 (6.25)	12.6 (6.93)	9.35 (4.13)	0.028	11.0 (5.01)	11.9 (7.44)	0.582	11.8 (5.09)	9.12 (4.54)	13.7 (8.94)	9.53 (4.00)	0.647
Galactosa	0.24 (0.65)	0.32 (0.78)	0.09 (0.24)	0.109	0.18 (0.38)	0.31 (0.86)	0.473	0.18 (0.40)	0.18 (0.34)	0.51 (1.11)	0.03 (0.09)	0.185
Sacarosa	26.4 (15.4)	29.5 (15.7)	20.7 (13.4)	0.028	25.7 (13.3)	27.2 (17.7)	0.705	29.5 (12.3)	16.3 (11.1)	29.6 (20.0)	24.1 (14.5)	0.357
Maltosa	0.95 (1.79)	1.14 (2.18)	0.61 (0.56)	0.165	1.25 (2.35)	0.62 (0.74)	0.167	1.45 (2.75)	0.75 (0.63)	0.71 (0.88)	0.51 (0.50)	0.607
Lactosa	10.9 (6.17)	10.5 (6.04)	11.7 (6.49)	0.500	9.69 (5.31)	12.2 (6.85)	0.119	9.95 (4.93)	9.07 (6.43)	11.2 (7.41)	13.6 (6.07)	0.339
Fibra	20.7 (7.05)	21.4 (7.39)	19.5 (6.37)	0.299	21.0 (6.98)	20.5 (7.24)	0.771	21.9 (6.70)	18.9 (7.57)	20.8 (8.43)	20.0 (5.60)	0.577
Lignina	1.06 (0.52)	1.00 (0.43)	1.18 (0.65)	0.265	0.99 (0.44)	1.14 (0.59)	0.274	0.99 (0.44)	0.99 (0.47)	1.01 (0.42)	1.31 (0.75)	0.301
Celulosa	3.18 (1.54)	3.36 (1.63)	2.86 (1.33)	0.206	3.14 (1.41)	3.23 (1.69)	0.840	3.36 (1.50)	2.61 (1.04)	3.36 (1.84)	3.04 (1.53)	0.619
PNCS	3.60 (1.61)	3.61 (1.53)	3.58 (1.79)	0.941	3.64 (1.46)	3.55 (1.79)	0.831	3.70 (1.37)	3.49 (1.73)	3.48 (1.77)	3.64 (1.90)	0.680
PNCI	3.05 (1.53)	3.02 (1.60)	3.12 (1.43)	0.816	3.08 (1.47)	3.03 (1.62)	0.900	3.15 (1.57)	2.91 (1.29)	2.85 (1.69)	3.27 (1.56)	0.453
Fibra insoluble	7.96 (3.23)	8.21 (3.33)	7.52 (3.05)	0.430	7.71 (2.86)	8.25 (3.62)	0.528	7.97 (2.82)	7.06 (3.02)	8.53 (4.02)	7.88 (3.16)	0.885
Fibra soluble	4.51 (1.73)	4.64 (1.66)	4.25 (1.86)	0.426	4.50 (1.60)	4.51 (1.90)	0.970	4.60 (1.50)	4.23 (1.88)	4.70 (1.92)	4.27 (1.92)	0.949
Ratio Insol/Sol	1.80 (0.41)	1.77 (0.34)	1.85 (0.53)	0.514	1.73 (0.25)	1.87 (0.53)	0.198	1.74 (0.24)	1.69 (0.29)	1.80 (0.44)	1.97 (0.64)	0.306

Tabla 4.8 Ingesta de carbohidratos, azúcares y fibras (g/día), así como el ratio de ingesta de fibra insoluble frente a la soluble. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. PNCS, polisacáridos no celulósicos solubles; PNCI, polisacáridos no celulósicos insolubles. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Las recomendaciones relacionadas con la ingesta de carbohidratos y azúcares sencillos que se refieren a su distribución en la dieta en relación al total calórico han sido comentadas en el capítulo 4.2.1. En relación a la ingesta absoluta, los datos disponibles para el conjunto nacional son de 300g/día (1) y de 202g/día en mujeres entre 25-44 años (184), coincidiendo con los obtenidos para la población estudiada. Hay que mencionar que si bien se recomienda una ingesta de carbohidratos del 45-60% del aporte calórico de la dieta, no hay recomendaciones precisas basadas en valores de ingesta absolutos (1, 249, 254). En cualquier caso, los valores obtenidos en el presente estudio muestran un aporte deficitario de carbohidratos en la población estudiada.

En relación con la ingesta de fibra, la fibra dietética definida como el conjunto de carbohidratos no digeribles más la lignina, los polisacáridos no amiláceos solubles e insolubles (celulosa, hemicelulosas, pectinas, hidrocoloides), los oligosacáridos resistentes (fructo- y galacto-oligosacáridos) y el almidón resistente, se observó una ingesta de 20.7 ± 7.1 g/día (9.6g/1000kcal). La ingesta mínima recomendada en mujeres según los objetivos nutricionales para la población española, la EFSA y el IoM son de 25g/día (1, 249, 254), cantidad consensuada para mantener la función intestinal normal así como reducir el riesgo cardiovascular, el desarrollo de diabetes y la mejora del mantenimiento del peso corporal (254). Así, la población de estudio se situó por debajo de las recomendaciones y tan solo un 18.3% cumplió dichos objetivos. Además, se observó una alta variabilidad en los resultados debido a ingestas que duplicaron las recomendaciones y otras que se quedaron a la mitad de las mismas.

En los resultados de la encuesta ENIDE (2011), las mujeres presentaron una ingesta baja de fibra (9.2g/1000kcal), lo cual podría relacionarse con un consumo bajo de los alimentos que la aportan, como las legumbres, las frutas y verduras y los cereales (184). Estos datos coinciden con los resultados descritos en el Libro Blanco de la Nutrición que sitúa la ingesta de fibra en mujeres españolas en 8.3g/1000kcal (1). En la población aquí valorada, a pesar de que la ingesta es insuficiente, las mujeres consumen cantidades superiores a las observadas en población española, aunque en todos los casos los resultados se sitúan por debajo de los valores recomendados de 14g/1000kcal (1).

Finalmente, el ratio de fibra insoluble frente a la soluble resultó de 1.8 ± 0.4 . Este ratio se establece en un rango entre 1.5 y 3 para la población española ya que es necesario guardar una proporción adecuada por los efectos diferenciados de ambos tipos de fibra (1). De hecho, en la última década han surgido evidencias que apuntan a la fibra insoluble y no la soluble como un componente protector frente a enfermedades cardiovasculares por lo que las últimas recomendaciones van más encaminadas a alcanzar un ratio insoluble/soluble más cercano a 3:1 que a 1.5:1 (1).

La fibra insoluble contribuye a reducir el tiempo de tránsito intestinal al aumentar la masa fecal mediante captación de agua. Por su parte, la fibra soluble tiene un efecto prebiótico en el colon de gran importancia en el mantenimiento de la salud. El consumo de fibra insoluble en España (2009) se situó en 11.1g/día mientras que el de fibra soluble fue de 7.6g/día (1). En la población estudiada, estos valores fueron en ambos casos más bajos, con una ingesta de fibra insoluble de 8.0 ± 3.2 g/día y de fibra soluble de 4.5 ± 1.7 g/día, sin embargo, el ratio de ingesta de fibra insoluble/soluble fue mayor.

4.2.3 Ingesta de micronutrientes y compuestos bioactivos

La valoración para la ingesta de micronutrientes se centró en aquellos que destacaron por su baja o alta aportación en comparación con las recomendaciones actuales (Tabla 4.9).

Micronutrientes (mg/día)	España	EEUU			Europa		
	IDR	RDA	AI	UL	PRI	AI	UL
Tiamina (B1)	1.1	1.4					
Riboflavina (B2)	1.6-1.7	1.6					
Niacina (B3)	17-18	17		35	6.6/1000kcal		
Ácido pantoténico (B5)			7			7	
Piridoxal (B6)	2	2		100			25
Biotina (B8, µg)			35			45	
Ácido fólico (B9, µg)	500	500		1000	500		1000
Cobalamina (B12, µg)	2.6	2.8				5	
Vitamina C	85	120		2000	155		
Vitamina A (µg)	1300	1300		3000	1300		3000
Carotenos totales (µg)							2000 en fumadores
Vitamina D (µg)	15	15		100		15	50
Vitamina E	17	19		1000		11	300
Tocoferol total							
Vitamina K (µg)			90				
Calcio (Ca)	1300	1000		2500	950		2500
Fósforo (P)	700	700		4000		550	
Hierro (Fe)	18	9		45	11		

Micronutrientes (mg/día)	España	EEUU			Europa		
	IDR	RDA	AI	UL	PRI	AI	UL
Zinc (Zn)	25	12		40	7.5-12.7 + 2.9		25
Magnesio (Mg)	450	320		350		300	250 procedente de suplementos o fármacos
Sodio (Na)			1500	2300			
Cloro (Cl)			2300	3600			
Potasio (K)	3500		5100				
Cobre (Cu)		1.3		10000		1.5	
Manganeso (Mn)			2.6	11		3	
Selenio (Se)	75	70		400		85	300
Yodo (I, µg)	155	290		1100		200	600
Flúor (F, µg)			3000	10000		50/kg	7000
Aluminio (Al, µg)	No hay valores de referencia disponibles						
Bromo (Br, µg)							
Níquel (Ni, µg)				1000			
Cromo (Cr, µg)			45				

Tabla 4.9 Valores de referencia para la valoración del estatus de micronutrientes de mujeres lactantes entre 25 y 44 años, con normopeso y baja actividad física. IDR, Ingestas diarias recomendadas; RDA, Ingestas diarias recomendadas para la población norteamericana; AI, Ingestas adecuadas; UL, Límite de ingesta máxima permitido; PRI, Ingestas de referencia para la población europea.

La deficiencia en micronutrientes se define como una ingesta promedio que no alcanza el 80% de las recomendaciones (268). Cuando más del 50% de la población estudiada presentó ingestas inferiores al 80% de las recomendaciones, clasificamos la ingesta para un nutriente determinado como deficiente. Por el contrario cuando el promedio para la población estudiada superó los límites tolerables establecidos por el IoM o la EFSA, con más del 50% de la población superando dicho nivel, se definió la situación como de riesgo por exceso de ingesta. En dichas valoraciones se tuvo en cuenta el consumo de suplementos. A lo largo del estudio se registró la marca y dosis de los suplementos consumidos durante los tres primeros meses de lactancia. El 57% de la población estudiada tomó suplementos durante la lactancia. La composición de los mismos fue muy variada, pero cuatro micronutrientes siempre estuvieron presentes: la vitamina B9, B12, el yodo y el hierro.

Para la evaluación de la ingesta de vitaminas B5, B8 y K y de los minerales sodio, cloro, manganeso, fluoruro y cromo, las referencias usadas fueron las ingestas adecuadas estimadas, ya que no se han establecido ingestas diarias recomendadas para estos nutrientes. Además, las ingestas observadas de carotenos, tocoferoles, aluminio, bromo y níquel no pudieron ser comparadas con ningún valor de referencia ya que no están disponibles en la actualidad.

4.2.3.1 Estatus de vitaminas

La valoración del estatus de vitaminas reveló riesgo por deficiencia en las ingestas de vitaminas B9, D y E, así como un riesgo por exceso en la ingesta de vitamina B3. Además observamos ingestas inadecuadas de vitaminas A, B5, B8, B12 y K. Para el resto de vitaminas (B1, B2, B6 y C) los niveles de ingesta siguieron las recomendaciones o ingestas adecuadas respectivas, por lo que no han sido evaluadas en profundidad a diferencia del resto.

Riesgo por deficiencia de vitaminas B9, D y E

La **vitamina B9 o folatos** totales es un término que engloba varios componentes presentes en los alimentos y químicamente inestables, así como el ácido fólico sintético, más estable químicamente, y que es la forma que se encuentra presente en suplementos y alimentos fortificados. Debido a la diferente biodisponibilidad de los diferentes compuestos, se ha establecido una equivalencia de 1:0.6 entre los folatos dietéticos y el ácido fólico, por lo que los resultados se expresan en equivalentes dietéticos de folatos.

La ingesta promedio para esta vitamina fue de $420 \pm 262 \mu\text{g}/\text{día}$ teniendo en cuenta el aporte extra a través de los suplementos (Tabla 4.10). Las recomendaciones de vitamina B9 durante la lactancia se han fijado en $500 \mu\text{g}/\text{día}$ (269, 270). Así, encontramos que el 59.3% de la población no alcanzó el 80% de las recomendaciones ($400 \mu\text{g}/\text{día}$) y por tanto se observa una ingesta deficiente en la población estudiada.

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor	
(mg/día)		N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12		
Alimentos + Suplementos	Hidrosolubles	Tiamina (B1)	1.70 (0.81)	1.76 (0.92)	1.60 (0.58)	0.415	1.69 (0.81)	1.71 (0.82)	0.894	1.75 (0.90)	1.53 (0.56)	1.76 (0.97)	1.65 (0.61)	0.812
		Riboflavina (B2)	2.21 (1.01)	2.34 (1.14)	1.99 (0.70)	0.153	2.21 (1.04)	2.22 (1.00)	0.953	2.37 (1.13)	1.81 (0.69)	2.29 (1.20)	2.12 (0.70)	0.490
		Niacina (B3)	41.8 (23.1)	43.6 (27.7)	38.4 (10.8)	0.311	38.5 (11.6)	45.4 (31.2)	0.282	39.4 (11.7)	36.2 (11.6)	49.3 (40.5)	40.1 (10.3)	0.639
		Ácido pantoténico (B5)	6.66 (3.12)	6.84 (3.38)	6.33 (2.64)	0.526	6.37 (2.92)	6.97 (3.36)	0.474	6.66 (3.14)	5.68 (2.31)	7.08 (3.78)	6.82 (2.86)	0.683
		Piridoxal (B6)	2.63 (1.33)	2.75 (1.44)	2.41 (1.11)	0.319	2.65 (1.38)	2.61 (1.30)	0.922	2.74 (1.42)	2.42 (1.31)	2.77 (1.50)	2.41 (1.00)	0.956
		Biotina (B8, µg)	37.7 (37.4)	42.5 (45.1)	28.9 (13.3)	0.090	37.1 (38.5)	38.3 (36.9)	0.898	42.7 (43.9)	23.3 (14.4)	42.3 (48.1)	33.1 (11.2)	0.623
		Folatos (B9, µg)	420 (262)	446 (281)	374 (221)	0.287	416 (272)	426 (255)	0.886	468 (298)	289 (137)	416 (264)	438 (254)	0.168
		Cobalamina (B12, µg)	6.16 (3.24)	6.56 (3.72)	5.42 (1.98)	0.131	6.07 (2.85)	6.25 (3.67)	0.836	6.54 (2.96)	4.93 (2.32)	6.59 (4.68)	5.79 (1.69)	0.657
		Vitamina C	141 (71.5)	158 (79.9)	111 (38.7)	0.003	152 (68.6)	129 (73.7)	0.212	162 (75.9)	129 (41.0)	153 (87.3)	96.8 (31.9)	0.546
	Liposolubles	Vitamina A (µg)	1105 (466)	1166 (481)	993 (425)	0.160	1145 (523)	1060 (398)	0.480	1217 (485)	971 (600)	1097 (482)	1010 (259)	0.539
		Carotenos totales (µg)	4035 (2116)	4296 (2157)	3564 (2003)	0.198	4348 (2418)	3689 (1698)	0.227	4706 (2363)	3475 (2460)	3733 (1753)	3630 (1698)	0.334
		Vitamina D (µg)	3.46 (3.39)	3.89 (3.80)	2.67 (2.36)	0.134	3.27 (2.64)	3.67 (4.11)	0.659	3.55 (2.32)	2.57 (3.35)	4.36 (5.27)	2.75 (1.41)	0.741
		Vitamina E	11.3 (5.75)	12.2 (6.71)	9.62 (2.83)	0.043	11.1 (4.29)	11.5 (7.11)	0.845	12.2 (4.23)	8.53 (3.31)	12.2 (9.27)	10.4 (2.20)	0.546
		Tocoferol total	7.05 (4.33)	7.75 (4.95)	5.79 (2.51)	0.048	6.98 (2.94)	7.14 (5.53)	0.895	7.26 (2.97)	6.30 (2.91)	8.43 (6.88)	5.41 (2.23)	0.387

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor	
		(mg/día)	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
		Vitamina K (µg)	169 (120)	170 (122)	167 (121)	0.917	178 (141)	159 (94.1)	0.528	180 (145)	175 (139)	157 (82.8)	160 (111)	0.907
Alimentos	Hidrosolubles	Tiamina (B1)	1.42 (0.43)	1.43 (0.47)	1.40 (0.35)	0.739	1.41 (0.44)	1.43 (0.43)	0.929	1.43 (0.48)	1.37 (0.35)	1.43 (0.48)	1.42 (0.37)	0.986
		Riboflavina (B2)	1.89 (0.60)	1.96 (0.66)	1.76 (0.47)	0.189	1.90 (0.67)	1.88 (0.53)	0.911	2.00 (0.66)	1.63 (0.64)	1.89 (0.67)	1.86 (0.29)	0.485
		Niacina (B3)	38.1 (19.8)	39.4 (23.8)	35.8 (8.75)	0.414	35.0 (6.85)	41.6 (27.7)	0.232	35.3 (6.18)	34.2 (8.66)	44.9 (35.9)	37.1 (8.99)	0.446
		Ácido pantoténico (B5)	5.44 (1.35)	5.42 (1.30)	5.47 (1.47)	0.886	5.21 (1.16)	5.68 (1.52)	0.193	5.30 (1.13)	5.01 (1.29)	5.58 (1.53)	5.82 (1.56)	0.532
		Piridoxal (B6)	2.23 (0.71)	2.28 (0.79)	2.13 (0.55)	0.393	2.26 (0.77)	2.19 (0.65)	0.684	2.29 (0.82)	2.20 (0.69)	2.27 (0.77)	2.08 (0.44)	0.863
		Biotina (B8, µg)	29.2 (12.3)	29.3 (11.8)	28.9 (13.3)	0.910	27.4 (11.1)	31.1 (13.4)	0.254	29.1 (9.28)	23.3 (14.4)	29.6 (15.0)	33.1 (11.2)	0.352
		Ácido fólico (B9, µg)	280 (107)	291 (113)	260 (94.8)	0.276	280 (122)	279 (90.6)	0.969	295 (125)	245 (112)	285 (98.3)	272 (82.8)	0.692
		Cobalamina (B12, µg)	5.51 (2.84)	5.82 (3.25)	4.95 (1.85)	0.196	5.45 (2.52)	5.57 (3.20)	0.878	5.75 (2.60)	4.71 (2.31)	5.90 (4.07)	5.12 (1.50)	0.717
		Vitamina C	130 (61.4)	143 (67.7)	108 (40.4)	0.016	141 (65.1)	118 (55.7)	0.145	149 (70.5)	122 (47.7)	134 (64.9)	96.8 (31.9)	0.120
	Liposolubles	Vitamina A (µg)	1088 (446)	1140 (454)	993 (425)	0.222	1145 (523)	1024 (339)	0.291	1217 (485)	971 (600)	1034 (397)	1010 (259)	0.391
		Carotenos totales (µg)	4035 (2116)	4296 (2157)	3564 (2003)	0.198	4348 (2418)	3689 (1698)	0.227	4706 (2363)	3475 (2460)	3733 (1753)	3630 (1698)	0.313
		Vitamina D (µg)	3.12 (2.89)	3.37 (3.15)	2.67 (2.36)	0.341	2.95 (2.11)	3.31 (3.59)	0.638	3.10 (1.42)	2.57 (3.35)	3.74 (4.62)	2.75 (1.41)	0.749
		Vitamina E	10.1 (3.82)	10.4 (4.29)	9.62 (2.83)	0.423	10.2 (3.37)	10.0 (4.32)	0.879	10.9 (3.23)	8.53 (3.31)	9.71 (5.46)	10.4 (2.20)	0.462

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
	(mg/día)	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
	Tocoferol total	7.05 (4.33)	7.75 (4.95)	5.79 (2.51)	0.048	6.98 (2.94)	7.14 (5.53)	0.895	7.26 (2.97)	6.30 (2.91)	8.43 (6.88)	5.41 (2.23)	0.303
	Vitamina K (µg)	168 (119)	168 (120)	167 (121)	0.964	178 (141)	156 (91.0)	0.469	180 (145)	175 (139)	152 (76.2)	160 (111)	0.911

Tabla 4.10 Ingesta de vitaminas hidrosolubles y liposolubles procedentes exclusivamente de los alimentos consumidos y más las cantidades que incluyen los suplementos consumidos durante la lactancia por parte de la población estudiada (mg o µg/día). Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Estos resultados concuerdan con un estado deficiente generalizado de las mujeres españolas, cuyas ingestas de folatos observadas son de $265 \pm 117 \mu\text{g}/\text{día}$ en edad adulta (25-44 años), con un 34% de la población que no alcanza las ingestas recomendadas, lo cual en edad fértil tiene especial relevancia por los defectos del tubo neural que puede provocar sobre el feto (1, 185). Este es el principal motivo por el cual se recomienda su suplementación durante la etapa de la concepción y también durante la lactancia, para asegurar unos niveles maternos óptimos, teniendo en cuenta las pérdidas asociadas a la síntesis de la leche (271), aunque el reconocimiento de la necesidad de una suplementación con folatos durante la lactancia aún no está extendido (81).

Los principales grupos de alimentos que contribuyen a la ingesta de vitamina B9 son las legumbres, los frutos secos, las verduras y hortalizas, frutas y cereales. El patrón de dieta mediterránea se ha relacionado recientemente con mayores niveles séricos de folatos (272), posiblemente relacionado a una mayor biodisponibilidad de esta vitamina en vegetales y frutas de la que anteriormente se pensaba (80% frente al 50% previamente descrito por el IoM) (273). En vista del bajo consumo de legumbres y frutos secos de la población estudiada en el contexto de la dieta, parece que equilibrar la dieta aumentando estos dos componentes y reduciendo otros como los cárnicos y lácteos podría ser una buena aproximación nutricional en la mejora del estatus de folato durante la lactancia en la población estudiada.

La **vitamina D o calciferol** es un término que engloba las dos isoformas activas (D_2 , ergocalciferol; D_3 , colecalciferol) más los metabolitos. La actividad biológica derivada de su presencia en los alimentos y otras fuentes se expresa en unidades internacionales (UI) de forma que $1 \mu\text{g}$ equivale a 40UI. Tanto la D_2 como la D_3 se obtienen de fuentes alimentarias (alimentos de origen vegetal o de origen animal, respectivamente). Sin embargo, su activación depende de la exposición solar por lo que establecer unas ingestas de referencia es complicado y depende fuertemente de factores geográficos y culturales.

El papel más claro de este grupo de componentes es sobre la regulación del metabolismo óseo y la homeostasis calcio/fósforo pero también se le ha atribuido recientemente un papel como pro-hormona y modulador de la expresión génica con funciones inmuno-moduladoras y anti-proliferativas de interés en la prevención y tratamiento del cáncer, enfermedades autoinmunes, diabetes de tipo I, enfermedades cardiovasculares e infecciones (274).

La ingesta promedio de vitamina D en la población estudiada fue de $3.46 \pm 3.39 \mu\text{g}/\text{día}$ (Tabla 4.10). La gran variabilidad se debe a ingestas de alimentos ricos en vitamina D distintas entre mujeres además de la suplementación recibida ($5 \mu\text{g}/\text{día}$) por cuatro mujeres durante la lactancia. Las ingestas diarias recomendadas para la vitamina D durante la lactancia para la población española se sitúan en los $15 \mu\text{g}/\text{día}$ (182), valor respaldado también por el IoM (275, 276) y que

la EFSA recientemente ha reconocido como la ingesta adecuada (277). De esta forma, observamos que un 94.9% no alcanzó el 80% de las recomendaciones ($12\mu\text{g}/\text{día}$), situando así a la población estudiada en deficiencia severa de esta vitamina durante la lactancia.

Las mujeres españolas entre 25 y 44 años presentan una ingesta de vitamina D de $3.52\pm 3.40\mu\text{g}/\text{día}$ según la encuesta ENIDE de 2011 (185). Así pues, la identificación de una situación de ingesta deficiente generalizada para toda la población española, coincide con lo observado en la población estudiada e incluso es más relevante por la situación fisiológica de lactancia que incrementa los requerimientos para esta vitamina. Aun así, debemos tener en cuenta que la población de estudio vive en un área mediterránea donde se dispone de 300 días soleados al año (278). Este hecho podría reducir significativamente la necesidad de alcanzar las ingestas recomendadas a través de la dieta, ya que 30 minutos diarios de exposición solar de la cara y los brazos, sin crema protectora, aportaría la cantidad de vitamina D diaria que necesita el organismo (279). A pesar de ello, más de la mitad de las participantes (38 de 59 mujeres) tuvo el parto en Invierno (21Dic-21Jun) lo cual podría comprometer la disponibilidad y frecuencia de exposición solar y por tanto la obtención de vitamina D activa. Por estos motivos y puesto que el paso de la vitamina D materna a la leche es pobre (57), actualmente se recomienda suplementar a los lactantes menores de un año que siguen lactancia materna con $400\text{UI}/\text{día}=10\mu\text{g}/\text{día}$.

La ingesta de **vitamina E**, entendida como el conjunto de componentes con dicha actividad vitamínica y que incluyen distintos isómeros de tocoferoles y tocotrienoles, fue de $11.3\pm 5.8\text{mg}/\text{día}$ en promedio (Tabla 4.10). Las recomendaciones para la población española durante la lactancia se establecen en $17\text{mg}/\text{día}$ (280), por lo que el 81.4% de la población estudiada estaría por debajo del 80% de la recomendación y por tanto en situación de deficiencia de vitamina E. Al comparar estos resultados con las ingestas estimadas para mujeres españolas entre 25 y 44 años (184) ($13.3\pm 6.1\text{mg}/\text{día}$) obtuvimos niveles inferiores.

Los requerimientos de vitamina E están relacionados con la ingesta de AGPI debido a su poder antioxidante. Concretamente se aconseja una ingesta de 0.4mg de vitamina E por gramo de AGPI ingeridos (1), lo cual se traduce en una ingesta de $6.3\text{mg}/\text{día}$ de vitamina E para una ingesta de $15.8\text{g}/\text{día}$ de AGPI ingeridos en promedio por las mujeres lactantes, valor que la mayoría (86.4%) alcanzó.

La EFSA ha establecido el valor de ingesta adecuada en $11\text{mg}/\text{día}$ (281) mientras que el IoM las ha fijado en $19\text{mg}/\text{día}$, procedentes exclusivamente del α -tocoferol (282). En ambos casos, el 96.6% de la población estudiada no alcanzó dichas recomendaciones (datos no mostrados).

Sin embargo, la ingesta promedio estimada de α -tocoferol en mujeres estadounidenses fue de 6.2 ± 0.1 mg/día (283), resultado similar al obtenido en las mujeres lactantes de este estudio de 6.3 ± 3.1 mg/día (datos no mostrados). Además, las ingestas estimadas en población estadounidense fueron declaradas como infravaloradas porque las cantidades y tipos de grasa adicionadas durante el cocinado son muchas veces desestimados o desconocidos. Por otro lado, la deficiencia de vitamina E en población infantil durante la lactancia es muy rara (284).

Por estos motivos la suplementación con vitamina E durante la lactancia parecería innecesaria (282) aunque ello no quita que encontremos una ingesta deficiente de vitamina E y α -tocoferol en la población estudiada de acuerdo a los valores de referencia disponibles.

Riesgo de ingesta de niacina superior al valor de ingesta máxima permitido (UL)

La **vitamina B3 o niacina** es un término genérico que contempla el ácido nicotínico y la nicotinamida. Esta vitamina puede sintetizarse en el organismo a partir del triptófano, se ha estimado que cada 60mg de triptófano ingerido suponen 1mg de equivalentes de niacina (EN) siempre y cuando no haya deficiencia de hierro, riboflavina o vitamina B6.

La ingesta promedio de niacina en la población estudiada fue de 41.8 ± 23.1 mg/día (Tabla 4.10). Las IDRs para mujeres españolas se sitúan en 18mg/día (280) y las americanas del IoM en 17mg/día para mujeres lactantes (270). La EFSA ha propuesto unas ingestas de referencia de 6.6mg/1000kcal (285), lo que en la población estudiada coincidiría con 14.2mg/día EN para las 2153kcal/día en promedio que ingieren las mujeres durante la lactancia. Todas las madres han presentado una ingesta de niacina que supera cualquiera de los valores de referencia comentados, y el 54.2% superó también el límite de ingesta máximo permitido propuesto por el IoM (UL=35mg/día) (Tabla 4.9), dato que coincide con las ingestas estimadas en mujeres españolas entre 25 y 44 años (40.3 ± 43.3 mg/día).

Aunque no se conocen efectos adversos asociados al consumo excesivo de niacina procedente de alimentos tal y como se presenta en la naturaleza, sí pueden aparecer por ingesta excesiva a partir de suplementos dietéticos, alimentos fortificados y/o productos farmacológicos; así pues la suplementación observada en once madres del estudio estaría inicialmente injustificada y podría suponer efectos adversos en el lactante (270). Los efectos adversos potenciales conocidos de la ingesta excesiva de niacina incluyen rubor, náuseas, vómitos, hepatotoxicidad, visión borrosa y alteración en la tolerancia a la glucosa (185).

Además, dado el papel relevante de la niacina en el metabolismo energético y su potencial epigenético (véase capítulo 4.3.4), los efectos de ingestas por encima del umbral máximo de

ingesta permitido durante la lactancia sobre la programación temprana de la obesidad podrían tener un consecuencias que hasta la fecha no han sido totalmente investigadas.

Ingestas inadecuadas de vitaminas B5, B8, A, B12 y K

La ingesta de **ácido pantoténico o vitamina B5** fue de 6.66 ± 3.12 mg/día (Tabla 4.10). Once mujeres recibieron un suplemento con 6 mg/día o más de esta vitamina. Actualmente no disponemos de ingestas recomendadas pero sí se ha establecido una ingesta adecuada durante la lactancia de 7 mg/día según el IoM y la EFSA (270, 286). De esta manera el 50.8% de la población estudiada no llegó a alcanzar los niveles adecuados de ingesta propuestos para suplir las pérdidas asociadas a la producción de leche materna. Aun así, no se puede definir una situación de deficiencia para esta vitamina en la población estudiada, por lo que se podría considerar que la suplementación sin otros factores condicionantes, parece innecesaria e inadecuada de acuerdo a la valoración nutricional que describimos en este estudio.

La ingesta de **biotina o vitamina B8** fue de 37.7 ± 37.4 µg/día (Tabla 4.10). La gran variabilidad se debe a la suplementación de 150 µg/día reportada en tres mujeres y de 52.5 µg/día en otra participante. Actualmente no se dispone de ingestas recomendadas para esta vitamina, pero se ha establecido una ingesta adecuada de 35 µg/día durante la lactancia según el IoM (270) y de 45 µg/día según la EFSA (287). En base al primer valor, el 47.5% no alcanzaría una ingesta adecuada mientras que si nos quedamos con el segundo dato, más actualizado, un 71.2% no llegaría a dicho valor, lo cual alerta de una posible situación de deficiencia aunque con el criterio adoptado, no se puede definir como tal. En cualquier caso, la suplementación reportada, particularmente en las tres mujeres que han recibido la dosis más alta, podría ser excesiva ya que las vitaminas hidrosolubles pasan a la leche y sus efectos aún se desconocen tanto en la madre, como en el lactante.

La ingesta promedio de **vitamina A o equivalentes de retinol (ER)** fue de 1105 ± 466 µg/día (Tabla 4.10). Este valor engloba un conjunto de compuestos con actividad vitamina A, los retinoides de origen animal y los carotenos de origen vegetal. Debido a su diferente biodisponibilidad, el resultado que se presenta responde a las equivalencias expresadas en función del compuesto más activo. Así, $1 \mu\text{g ER} = 1 \mu\text{g de retinol} = 6 \mu\text{g de beta-caroteno} = 12 \mu\text{g de otros carotenos}$.

Las recomendaciones de ingesta de vitamina A durante la lactancia son de 1300 µg/día por consenso de las tres fuentes consultadas (280, 288, 289), por lo que el 47.5% de la población estudiada presentó una ingesta deficiente para esta vitamina ($<1040 \mu\text{g/día}$), aunque los

resultados superaron las ingestas observadas en mujeres españolas entre 25 y 44 años ($738.6 \pm 336.5 \mu\text{g}/\text{día}$) de las cuales un 60% no alcanzó las IDRs. Hay que mencionar, que en la población de este estudio, se presentó un caso que recibió un suplemento de $1000 \mu\text{g}/\text{día}$ en forma de cápsulas durante la lactancia materna, lo cual no se consideraría necesario sin una valoración nutricional que identifique una deficiencia y la justifique (81, 290). Aunque la toxicidad para la vitamina A aparece a dosis más altas ($UL=3000 \mu\text{g}/\text{día}$), sus efectos sobre la composición de la leche materna o indirectamente sobre el lactante de dicha suplementación se desconocen.

La ingesta de **vitamina B12** fue de $6.16 \pm 3.24 \mu\text{g}/\text{día}$ (Tabla 4.10) lo cual superó ampliamente las IDRs para la población española durante la etapa de lactancia, situadas en $2.6 \mu\text{g}/\text{día}$ así como las RDAs americanas de $2.8 \mu\text{g}/\text{día}$ (270). La ingesta de vitamina B12 procedente exclusivamente de los alimentos fue de $5.51 \pm 2.84 \mu\text{g}/\text{día}$, valor muy semejante al descrito para mujeres españolas entre 25 y 44 años situado en $5.83 \pm 4.08 \mu\text{g}/\text{día}$ (185) y que coincide con las ingestas adecuadas estimadas por la EFSA para esta etapa ($5 \mu\text{g}/\text{día}$) (291).

Estos datos sitúan fuera de riesgo por ingesta insuficiente de vitamina B12 a la población estudiada, sin embargo el 28.8% recibió suplementación ya que casi todos los suplementos destinados a embarazadas y lactantes contienen un aporte extra para esta vitamina en un rango entre 2 y $4.6 \mu\text{g}/\text{día}$.

Actualmente no se conocen enfermedades o alteraciones asociadas a una deficiencia o falta de vitamina B12 durante el embarazo o la lactancia que sustente la suplementación, con excepción de mujeres vegetarianas estrictas o veganas (83, 292-294). Tampoco se han asociado efectos adversos relacionados con el exceso en la ingesta de vitamina B12 a partir de suplementos en individuos sanos debido a que las dosis administradas por vía oral solo se absorben en un porcentaje pequeño (40-50%) (1, 270). Aun así, es importante conocer los niveles que se ingieren de vitamina B12 durante etapas perinatales, ya que esta vitamina es un importante cofactor en reacciones relacionadas con procesos epigenéticos (142).

La ingesta de **vitamina K** fue de $169 \pm 120 \mu\text{g}/\text{día}$ (Tabla 4.10). Una madre recibió un suplemento con $75 \mu\text{g}/\text{día}$ de esta vitamina. En la actualidad disponemos de un único valor de ingestas adecuadas para esta vitamina durante la lactancia fijadas por el IoM en $90 \mu\text{g}/\text{día}$ (289), valor que supera el 69.5% de las mujeres. Además, las ingestas observadas suponen un 188% las ingestas adecuadas estimadas.

La vitamina K se encuentra en verduras de hoja verde, aceites vegetales, legumbres, quesos y alimentos de origen animal. La alta variabilidad observada puede deberse a factores asociados al proceso de valoración nutricional y relacionados con la disponibilidad de datos en la base de

composición de alimentos del software utilizado. En cualquier caso se han observado ingestas superiores a los valores de ingestas adecuadas disponibles, que se sitúan dentro de los rangos actualmente consumidos por la población española (1).

En definitiva, identificamos un estatus de vitaminas inadecuado al estado fisiológico de lactancia materna en base a los valores de referencia disponibles en la actualidad y una suplementación arbitraria que no responde a las necesidades nutricionales reales de la población estudiada de acuerdo a la valoración nutricional desarrollada en este estudio.

4.2.3.2 Estatus de minerales

La valoración del estatus de minerales reveló riesgo por deficiencia en las ingestas de calcio, zinc y yodo, así como un riesgo por exceso en la ingesta de sodio. Además observamos ingestas inadecuadas de hierro en la mitad de la población estudiada que recibió suplementación lo cual llevó a ingestas por encima del umbral máximo de ingesta permitido mientras el resto de las mujeres mantuvieron un estado deficiente. Para el resto de minerales evaluados (Cl, K, Cu, Mn, Se, F, Ni, Cr) los niveles de ingesta siguieron las recomendaciones o ingestas adecuadas respectivas, por lo que no han sido evaluadas en profundidad a diferencia del resto.

Riesgo por deficiencia de los minerales calcio, zinc, magnesio y yodo

La ingesta promedio de **calcio** en la población de estudio fue de 879 ± 302 mg/día (Tabla 4.11). Las recomendaciones de ingesta para la etapa de lactancia se sitúan entre los 950 y los 1300mg/día, según la fuente consultada (275, 295). Si nos fijamos en las IDRs para la población española encontramos que un 76.3% no alcanzó el 80% de las recomendaciones (<1040mg/día) por lo que la población de estudio se identifica en riesgo de deficiencia de calcio.

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor	
		N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12		
Alimentos + Suplementos	(mg/día)	Ca	879 (302)	895 (319)	850 (275)	0.574	849 (315)	913 (290)	0.423	878 (302)	777 (353)	918 (350)	905 (197)	0.603
		P	1422 (351)	1435 (350)	1398 (360)	0.707	1378 (320)	1470 (382)	0.322	1415 (280)	1288 (406)	1463 (437)	1480 (314)	0.464
		Fe	36.8 (30.4)	42.0 (33.8)	27.3 (20.3)	0.042	36.7 (30.1)	36.8 (31.2)	0.993	42.5 (31.9)	22.8 (20.1)	41.3 (37.3)	30.8 (20.6)	0.586
		Zn	12.4 (6.34)	12.8 (7.11)	11.5 (4.70)	0.404	12.5 (6.66)	12.2 (6.08)	0.834	13.2 (7.21)	11.0 (5.14)	12.4 (7.17)	11.9 (4.53)	0.647
		Mg	303 (95.5)	315 (106)	282 (69.9)	0.155	301 (88.1)	305 (105)	0.870	320 (87.9)	256 (74.7)	308 (130)	301 (62.0)	0.284
		Na	2254 (702)	2188 (700)	2373 (707)	0.338	2219 (657)	2292 (759)	0.697	2206 (681)	2252 (635)	2163 (748)	2464 (771)	0.516
		Cl	2126 (558)	2016 (528)	2323 (568)	0.049	2106 (578)	2148 (544)	0.775	2068 (583)	2197 (590)	1945 (450)	2417 (558)	0.257
		K	3059 (765)	3142 (830)	2909 (623)	0.230	3021 (781)	3100 (760)	0.696	3110 (794)	2804 (746)	3185 (901)	2988 (534)	0.799
		Cu	1.51 (0.57)	1.59 (0.62)	1.36 (0.44)	0.104	1.51 (0.52)	1.50 (0.63)	0.914	1.60 (0.51)	1.31 (0.50)	1.57 (0.76)	1.39 (0.41)	0.750
		Mn	3.30 (2.21)	3.44 (2.49)	3.05 (1.61)	0.461	3.26 (2.56)	3.35 (1.79)	0.868	3.60 (2.92)	2.41 (1.03)	3.23 (1.81)	3.52 (1.83)	0.228
	Se	98.3 (30.2)	96.7 (24.3)	101 (39.1)	0.641	95.5 (25.7)	101 (34.7)	0.463	95.7 (20.3)	94.9 (37.3)	98.1 (29.7)	106 (41.4)	0.617	
	(µg/día)	I	163 (105)	175 (109)	142 (97.9)	0.237	157 (102)	170 (110)	0.641	175 (108)	113 (76.6)	175 (114)	163 (109)	0.394
		F	640 (233)	614 (179)	686 (308)	0.336	628 (214)	653 (257)	0.685	626 (186)	631 (284)	597 (175)	727 (331)	0.335
		Al	456 (243)	462 (187)	446 (327)	0.843	451 (251)	462 (239)	0.854	442 (171)	472 (397)	489 (209)	427 (281)	0.499
		Br	430 (307)	371 (289)	536 (318)	0.057	395 (310)	469 (305)	0.358	343 (304)	522 (302)	411 (271)	546 (342)	0.792
		Ni	101 (54.8)	106 (56.0)	92.8 (52.9)	0.375	104 (61.6)	98.7 (47.1)	0.729	115 (65.0)	75.4 (43.4)	93.3 (38.9)	106 (57.3)	0.086
		Cr	39.9 (17.7)	41.1 (19.1)	37.7 (15.1)	0.454	39.1 (15.1)	40.8 (20.5)	0.725	40.4 (13.1)	35.9 (19.7)	42.1 (25.6)	39.0 (11.3)	0.884

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor	
		N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12		
	Ratio	Ca/P	0.61 (0.12)	0.62 (0.13)	0.60 (0.12)	0.737	0.60 (0.13)	0.62 (0.12)	0.569	0.61 (0.13)	0.59 (0.14)	0.62 (0.13)	0.62 (0.10)	0.863
Alimentos	(mg/día)	Ca	876 (302)	891 (317)	848 (277)	0.598	845 (317)	909 (286)	0.417	875 (304)	773 (356)	912 (344)	905 (197)	0.574
		P	1419 (350)	1431 (349)	1396 (361)	0.719	1374 (320)	1468 (381)	0.311	1411 (280)	1284 (406)	1459 (435)	1480 (314)	0.450
		Fe	13.8 (4.40)	14.1 (4.95)	13.3 (3.23)	0.470	14.1 (4.66)	13.6 (4.17)	0.685	14.8 (4.87)	12.3 (3.77)	13.2 (5.08)	14.1 (2.67)	0.176
		Zn	9.94 (2.78)	9.97 (2.92)	9.88 (2.57)	0.903	10.1 (3.06)	9.73 (2.47)	0.581	10.4 (3.29)	9.38 (2.42)	9.33 (2.26)	10.3 (2.73)	0.203
		Mg	294 (85.2)	302 (92.8)	280 (69.4)	0.301	293 (86.6)	296 (85.2)	0.906	309 (87.4)	254 (75.7)	293 (102)	299 (60.4)	0.205
		Na	2254 (702)	2188 (700)	2373 (707)	0.338	2219 (657)	2292 (759)	0.697	2206 (681)	2252 (635)	2163 (748)	2464 (771)	0.516
		Cl	2126 (558)	2016 (528)	2323 (568)	0.049	2106 (578)	2148 (544)	0.775	2068 (583)	2197 (590)	1945 (450)	2417 (558)	0.257
		K	3059 (765)	3142 (830)	2909 (623)	0.230	3021 (781)	3100 (760)	0.696	3110 (794)	2804 (746)	3185 (901)	2988 (534)	0.799
		Cu	1.43 (0.45)	1.46 (0.46)	1.36 (0.44)	0.387	1.45 (0.46)	1.40 (0.45)	0.684	1.50 (0.44)	1.31 (0.50)	1.41 (0.49)	1.39 (0.41)	0.480
		Mn	3.20 (2.16)	3.28 (2.42)	3.05 (1.61)	0.663	3.19 (2.58)	3.21 (1.61)	0.971	3.50 (2.96)	2.41 (1.03)	2.97 (1.44)	3.52 (1.83)	0.173
	Se	98.3 (30.2)	96.7 (24.3)	101 (39.1)	0.641	95.5 (25.7)	101 (34.7)	0.463	95.7 (20.3)	94.9 (37.3)	98.1 (29.7)	106 (41.4)	0.617	
	(µg/día)	I	92.3 (26.8)	89.9 (24.7)	96.5 (30.4)	0.403	89.8 (25.7)	94.9 (28.2)	0.474	87.2 (19.9)	96.4 (36.8)	93.7 (30.4)	96.5 (26.3)	0.668
		F	640 (233)	614 (179)	686 (308)	0.335	628 (214)	653 (256)	0.687	626 (186)	631 (284)	597 (175)	727 (331)	0.334
		Al	456 (243)	462 (187)	446 (327)	0.843	451 (251)	462 (239)	0.854	442 (171)	472 (397)	489 (209)	427 (281)	0.499
		Br	430 (307)	371 (289)	536 (318)	0.057	395 (310)	469 (305)	0.358	343 (304)	522 (302)	411 (271)	546 (342)	0.792
		Ni	101 (54.8)	106 (56.0)	92.8 (52.9)	0.375	104 (61.6)	98.7 (47.1)	0.729	115 (65.0)	75.4 (43.4)	93.3 (38.9)	106 (57.3)	0.086

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
		N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
	Cr	39.2 (15.0)	40.1 (15.1)	37.7 (15.1)	0.568	39.1 (15.1)	39.4 (15.2)	0.951	40.4 (13.1)	35.9 (19.7)	39.6 (18.0)	39.0 (11.3)	0.641
Ratio	Ca/P	0.61 (0.12)	0.62 (0.13)	0.60 (0.12)	0.737	0.60 (0.13)	0.62 (0.12)	0.569	0.61 (0.13)	0.59 (0.14)	0.62 (0.13)	0.62 (0.10)	0.863

Tabla 4.11 Ingesta de minerales procedentes exclusivamente de los alimentos más las cantidades que incluyen los suplementos consumidos durante la lactancia por parte de la población estudiada (mg o µg/día). Se incluyen los resultados para los ratios de interés en la valoración nutricional entre el calcio y el fósforo (Ca/P), hierro y zinc (Fe/Zn), ácido fítico y zinc (Ác.Fít/Zn), sodio y potasio (Na/K) y proteínas y potasio (Prt/K). Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Ca, calcio; P, fósforo; Fe, hierro; Zn, zinc; Mg, magnesio; Na, sodio; Cl, cloro; K, potasio; Cu, cobre; Mn, manganeso; Se, selenio; I, yodo; F, flúor; Al, aluminio; Br, bromo; Ni, níquel; Cr, cromo. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

La población de mujeres españolas entre 25 y 44 años presenta una ingesta de calcio de 851 ± 299 mg/día según la encuesta ENIDE del 2011, obteniendo una valoración de ingestas adecuadas que se ven truncadas cuando las mujeres entran en etapa perinatal por el aumento de los requerimientos de este mineral. Además, las IDRs para el calcio fueron actualizadas y aumentadas en el año 2013 por lo que distan de las utilizadas en la encuesta de 2011 y acentúan el riesgo por deficiencia identificado.

La deficiencia de calcio se asocia tanto a una ingesta insuficiente del mismo, como a deficiencia de vitamina D o a un ratio Ca/P plasmático menor de 1.3:1, ya que el fósforo sanguíneo reduce los niveles de calcio al incrementar su excreción renal promoviendo la pérdida de masa ósea (182, 185). En la población estudiada se ha identificado un cierto riesgo por deficiencia en la ingesta de vitamina D (capítulo 4.2.3.1) y el ratio Ca/P ha sido de 0.61 ± 0.12 asociado a la ingesta de fósforo que duplicó las recomendaciones. Todo ello junto con una ingesta elevada de sodio que también promueve la excreción urinaria de calcio, podría contribuir a acelerar la pérdida de masa ósea (1), lo que hace que la nutrición cálcica deba ser especialmente considerada en esta etapa.

Cinco mujeres del estudio recibieron un suplemento con 40-55mg/día de calcio durante la lactancia, cantidades insuficientes para alcanzar las recomendaciones en base a las ingestas observadas en la población estudiada. La suplementación con calcio durante la lactancia no ha sido totalmente respaldada (183, 296), pero se recomienda la ingesta de cinco porciones diarias de alimentos ricos en calcio durante esta etapa para poder alcanzar las recomendaciones a través de la dieta (83).

La ingesta promedio de **zinc** fue de 12.4 ± 6.3 mg/día (Tabla 4.11). Las recomendaciones de ingesta durante la lactancia para este mineral distan significativamente entre las distintas fuentes consultadas llegando a coincidir las IDRs para la población española con el límite de ingesta máxima permitido establecido por la EFSA (25mg/día) (297) y siendo las recomendaciones de ingesta del IoM y de la EFSA la mitad de las IDRs. En particular, ingestas de zinc por encima de los UL (40 y 25mg/día respectivamente) e incluso a partir de los 15mg/día se asocian con problemas inmunitarios, sanguíneos y neurológicos (185, 298).

Por estos motivos y puesto que disponemos del promedio para la ingesta de fitatos, componente alimentario que interfiere en la biodisponibilidad del zinc, optamos finalmente por trabajar con la propuesta más reciente de la EFSA según la cual para una ingesta de fitatos promedio de 217 ± 186 mg/día por parte de la población estudiada (Tabla 4.12), la ingesta mínima de referencia para mujeres mayores de 18 años y con un peso promedio de 58.5kg es de 7.5 ± 2.9 mg/día por el coste adicional que supone la lactancia.

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(mg/día)	N=59	N=38	N=21		N=31	N=28		N=22	N=9	N=16	N=12	
Fitosteroles totales	52.6 (32.4)	61.4 (35.7)	36.6 (16.4)	0.001	54.1 (27.5)	50.9 (37.5)	0.713	60.0 (27.5)	39.8 (23.0)	63.4 (45.5)	34.2 (9.41)	0.601
Betasitosterol	30.3 (23.5)	35.5 (27.2)	21.0 (9.40)	0.004	30.3 (15.5)	30.4 (30.3)	0.983	34.4 (15.2)	20.1 (11.6)	37.0 (38.7)	21.7 (7.87)	0.942
Estigmasterol	5.58 (3.15)	6.19 (3.51)	4.48 (2.02)	0.020	5.61 (2.15)	5.55 (4.02)	0.942	6.09 (2.00)	4.46 (2.18)	6.34 (4.97)	4.49 (1.98)	0.898
Campesterol	3.58 (2.78)	4.15 (3.11)	2.53 (1.64)	0.011	3.80 (2.75)	3.33 (2.83)	0.521	4.33 (2.81)	2.50 (2.26)	3.91 (3.57)	2.56 (1.10)	0.749
Quercetina	0.65 (0.73)	0.62 (0.72)	0.71 (0.75)	0.637	0.61 (0.80)	0.70 (0.65)	0.660	0.59 (0.82)	0.68 (0.81)	0.66 (0.59)	0.74 (0.74)	0.976
Cafeína	12.9 (13.7)	13.7 (14.8)	11.4 (11.6)	0.510	14.8 (15.9)	10.8 (10.6)	0.259	16.2 (17.5)	11.4 (11.5)	10.4 (9.64)	11.4 (12.2)	0.449
Teobromina	28.0 (31.1)	30.8 (29.6)	23.1 (33.9)	0.393	21.3 (25.9)	35.5 (35.1)	0.085	26.8 (27.9)	7.77 (13.5)	36.2 (32.0)	34.6 (40.3)	0.301
Fosfatidilcolina	184 (74.7)	181 (71.4)	190 (81.9)	0.684	182 (71.1)	187 (79.8)	0.798	193 (70.0)	155 (70.3)	165 (72.3)	216 (82.9)	0.032
Ácido fítico	217 (186)	197 (165)	252 (218)	0.321	181 (151)	257 (213)	0.122	186 (164)	167 (122)	212 (171)	317 (255)	0.223

Tabla 4.12 Ingesta de compuestos bioactivos (mg/día) y ácido fítico (g/día). Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

En base a estos datos, no se observó una situación de riesgo por deficiencia aunque si el valor de referencia tomado en cuenta fuera el propuesto para la población española, entonces el 86.4% de la población estudiada estaría por debajo del 80% de las IDRs, lo cual situaría a la población estudiada en un estatus deficiente en zinc durante la lactancia.

En la población española la ingesta observada de zinc en mujeres entre 25 y 44 años fue de 8.8 ± 0.1 mg/día y se determinó un estatus de deficiencia, aunque en el mismo informe ENIDE se reconoce que la carencia por causas dietéticas es poco frecuente y se ha descrito tan solo en situaciones de malabsorción.

Un 18.6% de la población estudiada recibió suplementos con 10-25mg/día de zinc. Hasta el momento no hay consenso en la necesidad de suplementar la dieta de la mujer lactante con este mineral aunque si se ha propuesto incrementar su ingesta a partir de los alimentos en un 50% durante esta etapa (81). En términos generales encontramos bastante confusión en la bibliografía consultada para la definición del estatus de zinc lo que nos dificulta la valoración nutricional de la población estudiada. De la misma forma llama la atención que los suplementos proporcionados durante la etapa perinatal contengan niveles de zinc que limitan con el UL establecido por la EFSA.

La ingesta de **magnesio** en la población de estudio fue de 303 ± 95 mg/día (Tabla 4.11). Las IDRs para población española son de 450mg/día durante la lactancia (1), mientras que para la población americana se han establecido en 320mg/día (299) y la EFSA ha definido unas AIs de 300mg/día (300). En base a las primeras, encontramos que el 81.4% de la población de estudio no alcanzó el 80% de las recomendaciones (<360 mg/día), situándose en riesgo por deficiencia de este mineral durante la lactancia. Sin embargo, si tomáramos las RDAs americanas solo un 33.9% no superaría el 80% de las recomendaciones (<256 mg/día), por lo que el estatus de magnesio se definiría como adecuado en la población. Por su parte, la EFSA ha estimado recientemente que solo se puede fijar una ingesta adecuada de 300mg/día al no disponer de biomarcadores adecuados para proponer y valorar ingestas de referencia.

Las mujeres españolas entre 25 y 44 años presentan ingestas de 356.1 ± 120.3 mg/día de magnesio según la encuesta ENIDE superando así las IDRs y no habiéndose identificado un riesgo por deficiencia en ningún grupo de edad. Así pues, es posible que la ingesta relativamente deficiente observada en el presente estudio se asocie a un buen estado de salud, a pesar de que los requerimientos estimados son superiores durante la lactancia según las IDRs para mujeres españolas lactantes.

A pesar de que no hay un claro consenso en el uso de suplementos de magnesio en la mujer lactante (81), el estatus deficitario se observó aun cuando un 18.6% de las mujeres recibieron

una suplementación de 15-200mg/día. En ningún caso se reportó un aporte extra superior a 250mg/día, fijado como UL por la EFSA para el magnesio procedente de suplementos o fármacos (297), aunque un 18.6% superó el UL fijado por el IoM en 350mg/día.

El hecho de que las IDRs para la población española supere el UL para la población americana, junto con la observación de un estatus adecuado de la población española general, así como la ausencia de síntomas claros asociados a la deficiencia de magnesio y por su amplia distribución en los distintos grupos de alimentos, llegamos a la conclusión de que no se puede considerar un estatus de deficiencia para este mineral en la población estudiada.

La ingesta de **yodo** en la población estudiada fue de $163 \pm 105 \mu\text{g}/\text{día}$ (Tabla 4.11). Las IDRs se sitúan en los $155 \mu\text{g}/\text{día}$ (1), mientras que las RDAs americanas son de $290 \mu\text{g}/\text{día}$ para la etapa de lactancia (289). Por su parte la EFSA ha definido una ingesta adecuada de $200 \mu\text{g}/\text{día}$ (301). A pesar de que el 35.6% de la población recibió suplementos de 150-350 $\mu\text{g}/\text{día}$ de yodo, un 62.7% no alcanzó el 80% de las IDRs por lo que se identificó una situación de riesgo por deficiencia de yodo en la población estudiada.

El yodo es un componente esencial de las hormonas tiroideas, la tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3). La deficiencia de yodo en los primeros estadios de la vida tiene efectos importantes sobre el desarrollo cerebral. Las hormonas tiroideas son de gran importancia para la mielinización del sistema nervioso central, acción que tiene un pico de actividad durante la etapa perinatal (289). Durante la lactancia, el yodo se requiere para acomodar los cambios en el metabolismo tiroideo materno que tienen lugar para sobrellevar la lactancia, así como para suplir las necesidades de crecimiento y desarrollo del bebe (183).

En la población estudiada, la ingesta promedio de yodo obtenida a partir de los alimentos fue de $92.3 \pm 26.8 \mu\text{g}/\text{día}$, por lo que a pesar de que la suplementación de una parte de las mujeres mejoró la situación, el estatus de yodo global para la ingesta de este mineral es crítico.

De acuerdo a estudios e informes recientes llevados a cabo en España (302, 303), se conoce la necesidad de mejorar las estrategias de salud pública para evitar la deficiencia de yodo durante el embarazo y la lactancia mediante la mejora de la calidad de la dieta (elevando el consumo de pescado, productos lácteos, vegetales y cereales en detrimento de carnes, huevos y grasas), la promoción de la suplementación dietaria a través de la sal yodada y la correcta suplementación con $200 \mu\text{g}/\text{día}$ cuando se requiera o siempre hasta que no se implemente de forma clara la yodación universal de la sal (81, 82, 87, 304).

Riesgo por ingesta de sodio elevada

La ingesta de **sodio** dietético incluyendo el contenido en la sal de mesa observado en la población de estudio fue de 2254 ± 702 mg/día (Tabla 4.11). La valoración de la ingesta de sal añadida en las comidas se hizo mediante una escala de cantidades aproximadas. El IoM ha establecido unas ingestas adecuadas de 1500mg/día y un umbral máximo de ingesta permitido de 2300mg/día (305), mientras que los objetivos nutricionales para la población española son de <2000 mg/día (1). De acuerdo con estos valores de referencia, las mujeres durante la etapa de lactancia mostraron ingestas de sodio alrededor de dichos valores, si bien un 37.3% superó el UL.

En mujeres españolas entre 25 y 44 años, la ingesta observada procedente exclusivamente de los alimentos es de 2420 ± 837 mg/día, lo cual supera ligeramente el valor observado aquí, más aun considerando la sal de mesa no contabilizada en la encuesta ENIDE (185). Aun así, la determinación urinaria de sodio ha puesto de manifiesto que la población española adulta llega a ingerir unos 9.7g/día de sal, duplicando los objetivos propuestos de <5 g/día según la OMS (1).

La ingesta de sodio por encima del umbral máximo de ingesta permitido de forma crónica aumenta la presión arterial, lo cual es un factor de riesgo cardiovascular claro y relevante en la población general. En el embarazo y la lactancia algunos estudios han identificado efectos negativos sobre la descendencia así como un cese temprano de la lactancia materna (306-310), por lo que vale la pena prestar mayor atención a la ingesta sostenida de sodio por encima de las recomendaciones, especialmente durante etapas de desarrollo.

Ingestas inadecuadas de hierro

La ingesta promedio de **hierro** en la población estudiada fue de 36.8 ± 30.4 mg/día (Tabla 4.11). La amplia variabilidad de los resultados se debió al hecho de que un 49.2% recibió suplementos con 14-105mg/día. Las IDRs para mujeres lactantes se sitúan en los 18mg/día (1), mientras que las RDAs americanas son de 9mg/día (289) y las PRI europeas de 11mg/día (311).

Los alimentos aportaron una ingesta de hierro de 13.8 ± 4.4 mg/día, similar a las ingestas descritas en mujeres españolas en edad fértil (12-14mg/día) (185). Así, un 61.0% de las mujeres estudiadas presentaron una ingesta insuficiente de hierro antes de recibir la suplementación ya que no alcanzaron el 80% de las IDRs (<14.4 mg/día). Sin embargo, la prevalencia de anemia ferropénica en mujeres embarazadas no es tan elevada situándose en un 30.2% a nivel mundial y un 27% en España (312, 313).

Si adoptamos los valores propuestos por la EFSA, tan solo un 6.8% estaría por debajo de dicho límite (80% PRI = 8.8mg/día), y la población no se identificaría en riesgo por deficiencia de hierro, de modo que no estaría justificada la suplementación de acuerdo a criterios exclusivamente dietéticos. Es decir, cabe la posibilidad de que el diagnóstico clínico de anemia justificara la suplementación recibida.

La alta prevalencia de la suplementación con hierro durante la lactancia se debe a las pérdidas que pueda suponer el parto, aunque la amenorrea mantenida durante el mismo periodo ya actúa como un mecanismo protector natural, motivo que lleva al IoM a bajar de 27 a 9mg/día las RDAs para el hierro en mujeres adultas respecto de las que están en etapa de lactancia. Además, observamos que un 42.4% superó el UL establecido en 45mg/día por el IoM y un 32.2% sigue en situación de deficiencia incluso teniendo en cuenta la suplementación.

Esto significa que la suplementación se hizo sin tener en cuenta los hábitos alimentarios y el estatus nutricional materno, lo cual deja a una parte de la población en situación de deficiencia de hierro, mientras que otra parte importante superó el umbral máximo de ingesta permitido para este mineral. Teniendo en cuenta estos aspectos y la falta de respaldo para la suplementación con hierro durante la lactancia parecería oportuno abandonar esta práctica clínica hasta confirmar que no existan consecuencias adversas asociadas especialmente por exceso (314).

Suplementación inadecuada con fósforo y otros minerales

La ingesta de **fósforo** fue de 1422±351mg/día tal como se ha comentado durante la valoración previa del estatus de calcio por su implicación en la salud ósea y el metabolismo osteocálcico (1). Las IDRs para este mineral son de 700mg/día, valor que superó toda la población estudiada, aunque en ningún caso se superó el UL de 4000mg/día fijado por el IoM (299). Por su parte la EFSA ha establecido una ingesta adecuada aún menor (550mg/día) (315).

Los altos valores obtenidos se asocian a la contribución importante de alimentos ricos en proteínas como carnes, pescados, lácteos y huevos, así como cereales y legumbres en el conjunto de la dieta y que son ricos en fósforo. Aunque la hiperfosfatemia dietética solo supone un problema en enfermedades renales severas, por su interferencia con la absorción de otros minerales y su papel en la resorción ósea, en la actualidad se está investigando los posibles efectos adversos causados por ingestas altas de fósforo (276).

Aun así, las ingestas observadas fueron similares a las obtenidas para mujeres españolas entre 25 y 44 años de 1303±377mg/día (185) y para la población europea entre 1000-1767mg/día.

Además, parece ser inadecuada la suplementación con fósforo que recibió un 8.5% de la población evaluada, a pesar de observar ingestas por encima de los valores de referencia de forma clara y generalizada.

De igual manera se estimó inadecuada la suplementación sin base científica suficiente durante la lactancia para otros minerales como el flúor, el molibdeno, el manganeso, el selenio, el cromo y el cobre.

En definitiva, identificamos un estatus de minerales inadecuado al estado fisiológico de lactancia materna en base a los valores de referencia disponibles en la actualidad y una suplementación arbitraria que no responde a las necesidades reales de la población estudiada de acuerdo a la valoración nutricional descrita en este estudio.

4.2.3.3 Ingesta de compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos son metabolitos secundarios, generalmente de origen vegetal, que si bien no se consideran nutrientes por no ser indispensables en los procesos fisiológicos, se han relacionado con efectos beneficiosos en el estado de salud, por lo que en las últimas décadas han adquirido cierta relevancia y se empieza a considerar su papel nutricional (1).

El software de valoración nutricional utilizado en este estudio incluye en su base de datos de composición de alimentos el contenido para varios de ellos: fitoesteroles, quercetina, cafeína, teobromina, fosfatidilcolina y ácido fítico. Las ingestas estimadas para la población estudiada se presentan en la Tabla 4.12.

Los **fitoesteroles** vegetales son compuestos con una estructura muy similar al colesterol, por lo que compiten a nivel intestinal con su absorción, tanto del colesterol procedente de los alimentos como del colesterol que forma las sales biliares vertidas para la correcta absorción de las grasas durante la digestión. Esta propiedad se traduce en un cierto efecto hipocolesterolemiantes, que posibilita el uso de declaraciones de salud en alimentos que los contienen de acuerdo con los requisitos de aplicación indicados por la EFSA (316).

Dicho efecto hipocolesterolemiantes se puede conseguir con ingestas de al menos 800mg/día. Las ingestas observadas en la población estudiada se sitúan en los 52.6 ± 32.4 mg/día (Tabla 4.12), por lo que a pesar de que la EFSA sugiere la posibilidad de alcanzar las dosis terapéuticas mediante una dieta equilibrada en su informe científico de 2010 (316), el patrón de alimentación de la población estudiada, no parece proveer de los niveles suficientes para beneficiarse del efecto preventivo de control de los niveles de colesterol en sangre. Además estos niveles de ingesta de fitoesteroles son sustancialmente inferiores a los registrados en población europea recientemente (83-966 mg/día) (317).

Incluso para obtener el beneficio terapéutico una vez instaurada la hipercolestolemia, es decir, una reducción entre el 7-10% de los niveles de colesterol en sangre, es necesario alcanzar una ingesta de 1.5-2.4g/día a través de una matriz alimentaria adecuada tal como la que ofrecen alimentos enriquecidos con fitoesteroles (margarinas, mayonesas, salsas y derivados lácteos) (318).

La **quercetina** es un flavonoide distribuido ampliamente en el reino vegetal y que se ha asociado con numerosas propiedades beneficiosas para la salud, especialmente por su actividad antioxidante, protección cardiovascular y acción antiinflamatoria (319). Sin embargo, la valoración efectuada por la EFSA considera que no queda suficientemente establecida una relación causa efecto entre su ingesta y dichos efectos sobre la salud (320).

En población europea se ha estimado una ingesta de entre 2-23.7mg/día (321), valores que superan las ingestas observadas en la población estudiada (0.65 ± 0.73 mg/día) (Tabla 4.12). La gran varianza obtenida se debe a la ausencia de su consumo por una parte de las mujeres, así como a la base de datos de composición de los alimentos que es incompleta en relación a este compuesto.

La **cafeína** es un alcaloide del grupo de las metilxantinas con propiedades estimulantes. La EFSA ha reconocido que permite el incremento del estado de alerta y la mejora de la atención con ingestas por encima de los 75mg por toma (322). Si bien, aconseja un consumo moderado de cafeína procedente de cualquier fuente alimentaria durante el embarazo y la lactancia.

En los servicios sanitarios también está extendida la recomendación de evitar o moderar el consumo de alimentos y bebidas ricos en cafeína durante etapas perinatales. Tal vez asociado a ello, se han encontrado bajos niveles de ingesta de cafeína en la población estudiada (12.9 ± 13.7 mg/día) (Tabla 4.12), mientras que las ingestas descritas en población general en distintos países Europeos están en un rango entre los 168mg/día en Reino Unido y los 390mg/día en Dinamarca (323).

La **teobromina** es también un alcaloide del grupo de las metilxantinas presente en las plantas de cacao, té y cola que se ha propuesto como un compuesto beneficioso sobre factores de riesgo cardiometabólicos (324).

La ingesta promedio de teobromina en la población de estudio fue de 28.0 ± 31.1 mg/día (Tabla 4.12). Las ingestas de teobromina proceden en mayor medida del consumo de cacao y chocolate (325) por lo que en la mayoría de estudios disponibles en la actualidad (324, 326, 327) se ha cuantificado el consumo de estos alimentos en lugar de disponer de la ingesta de teobromina diaria a partir del conjunto de la dieta. Sin embargo, las dosis diarias habituales de ingesta de teobromina se han estimado entre 50-150mg/día, muy lejos de las dosis para las que se han

observado mejoras en el perfil de lipoproteínas en sangre de más de 500mg/día. De acuerdo a estos datos, las ingestas observadas en la población estudiada son aún inferiores a las estimaciones descritas en la bibliografía y están muy por debajo de la dosis necesaria para conseguir un aumento de lipoproteínas de alta densidad (324).

La **fosfatidilcolina** es un fosfolípido presente en las membranas celulares. Se suele comercializar en forma de lecitina (asociada a ácidos grasos) que se extrae de la yema de huevo y la soja. Se han propuesto distintos efectos beneficios relacionados con su consumo, si bien hasta la fecha no se ha aprobado ninguna declaración de salud concreta para este compuesto bioactivo (328).

La ingesta de fosfatidilcolina en la población de estudio fue de 184 ± 74.7 mg/día (Tabla 4.12). Las ingestas en otras poblaciones para este componente bioactivo no suelen presentarse por lo que no podemos comparar nuestros resultados. Sin embargo es más habitual encontrar ingestas de colina, precursor de la fosfatidilcolina. Además, este componente se estudia con mayor frecuencia durante etapas perinatales del desarrollo humano (329-332) y se disponen de ingestas adecuadas estimadas para la colina (270). Por ello, y de cara a futuras investigaciones o valoraciones de la ingesta de compuestos bioactivos como la fosfatidilcolina, parece más adecuado contar con bases de composición de alimentos que contemplen la colina en lugar de la fosfatidilcolina.

Por último disponemos de resultados para la ingesta de **ácido fítico**, término utilizado para definir un grupo de compuestos también denominados fitatos e inositoles de polifosfato que interfieren en la biodisponibilidad de varios minerales, especialmente del zinc como se ha comentado en el capítulo 4.2.3.2. El ácido fítico se encuentra en alimentos de origen vegetal, especialmente en semillas y cereales integrales y en los últimos años, se le ha atribuido una actividad antioxidante notable (333) así como sobre la formación de cálculos renales (334).

La ingesta de ácido fítico en la población de estudio fue de 217 ± 186 mg/día (Tabla 4.12). La comparación con ingestas observadas en el contexto de una dieta mediterránea (422-672mg/día) (335) pone de manifiesto una ingesta muy baja de fitatos por parte de las mujeres del estudio.

En definitiva observamos que para la mayoría de los compuestos bioactivos evaluados, las ingestas observadas fueron inferiores a las disponibles en la bibliografía. Para algunos compuestos bioactivos aún no se disponen de bases completas de composición de alimentos que permitan unas estimaciones precisas. El estudio de compuestos bioactivos alimentarios es un campo en crecimiento tanto en el conocimiento de las ingestas habituales que lleva a cabo la población como sobre los potenciales efectos beneficiosos sobre la salud que pudieran tener

cada uno de ellos. Profundizar en este campo tiene gran interés aunque no ha sido el objetivo del presente estudio.

4.2.4 Identificación de patrones de alimentación específicos

Tras la evaluación de la ingesta para cada uno de los nutrientes y componentes de interés por separado se llevó a cabo un estudio para la identificación de patrones de alimentación de su ingesta, así como por grupos de alimentos, siguiendo la metodología descrita previamente en el capítulo 3.5.6.2.

4.2.4.1 Perfiles nutricionales

La ingesta de la población se ajustó a cuatro perfiles nutricionales (PN1-PN4) para los cuales presentamos los coeficientes de correlación para cada uno de los nutrientes dentro de cada perfil, teniendo en consideración el consumo de suplementos y antes de corregir la ingesta por este factor (SS, sin suplementos). Para su interpretación se resaltaron aquellos nutrientes con coeficientes de correlación mayores a ± 0.3 en verde y rojo respectivamente para cada signo y en **negrita** para aquellos coeficientes situados entre ± 0.2 y ± 0.3 (Tabla 4.13).

Variables	Sin suplementos (A)				Con suplementos (B)			
	PN1SS	PN2SS	PN3SS	PN4SS	PN1	PN2	PN3	PN4
Proteínas	0.06	0.02	0.06	0.08	0.05	0.01	-0.01	0.05
Almidón	-0.03	-0.05	0.02	-0.30	-0.04	-0.03	-0.05	0.00
Azúcares	0.13	0.06	-0.08	0.06	0.10	0.04	-0.02	0.00
Fibra dietética	0.17	0.21	-0.26	0.11	0.14	0.17	0.08	-0.06
AGS	-0.07	-0.03	0.22	0.05	-0.07	-0.04	-0.04	0.14
AGMI	-0.11	-0.01	-0.03	0.06	-0.06	-0.01	0.09	-0.06
AGPI	0.01	-0.03	-0.12	0.10	-0.02	0.02	-0.05	-0.11
Colesterol	-0.01	-0.17	0.31	0.27	-0.01	-0.14	-0.11	0.11
Tiamina	0.07	0.03	-0.06	0.14	0.23	0.04	0.20	-0.12
Riboflavina	0.15	0.03	0.08	0.13	0.27	0.03	0.12	0.01
Vitamina B6	0.11	0.08	-0.07	0.30	0.26	0.12	0.16	-0.15
Folatos	0.25	0.12	0.00	0.17	0.36	0.12	0.14	0.02
Vitamina B12	0.23	-0.13	0.05	-0.29	0.24	-0.05	-0.19	-0.04
Vitamina C	0.16	0.32	-0.27	0.43	0.21	0.30	0.13	-0.23
Retinoides	0.18	-0.42	0.50	0.45	0.07	-0.39	-0.38	0.29
Beta-carotenos	0.47	0.56	0.51	-0.28	0.28	0.55	-0.28	0.65
Vitamina D	0.64	-0.52	-0.29	-0.20	0.54	-0.37	-0.44	-0.26
Vitamina E	0.10	0.00	-0.23	0.10	0.20	0.01	0.04	-0.26
Calcio	0.12	-0.01	0.04	-0.03	0.09	-0.03	-0.04	0.09
Hierro	0.16	0.06	-0.04	0.06	0.27	-0.47	0.63	0.45
Magnesio	0.13	0.07	-0.12	0.07	0.15	0.06	0.02	-0.07
Potasio	0.11	0.10	-0.07	0.13	0.10	0.09	0.00	-0.03
Fósforo	0.10	0.01	-0.01	0.05	0.08	0.01	-0.03	0.02
Varianza acumulada explicada (%)	31.03	51.87	63.26	70.79	33.30	48.88	60.85	70.39

Tabla 4.13 Matriz de coeficientes de correlación y porcentaje de la varianza explicada por cada componente extraído. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó considerando el aporte de 23 nutrientes a partir de la ingesta de los alimentos que componen la dieta de la población estudiada (A) y añadiendo el aporte de los suplementos ingeridos (B). Se propuso como criterio descriptivo para cada perfil aquellos nutrientes con coeficientes de correlación mayores a ± 0.3 en verde y rojo respectivamente

para cada signo. En negrita se destacan los coeficientes situados entre ± 0.2 y ± 0.3 que pueden ayudar en su interpretación global.

El primer perfil nutricional identificado (PN1) explicó un 33.3% de la varianza total de la muestra y presentó un perfil rico en micronutrientes, destacando la elevada correlación que presentan la vitamina D (0.54), los folatos (0.36) y la mayoría de vitaminas (0.20-0.28), en particular del grupo B, así como el hierro (0.27). Se trataría de un patrón rico en vitaminas.

Este perfil cambió ligeramente cuando no se consideraron los suplementos, ya que si bien se mantuvo la correlación con la vitamina D (0.64), beta-carotenos (0.47), folatos (0.25) y vitamina B12 (0.23), quedaron en un segundo plano el resto de micronutrientes.

El segundo componente (PN2) añadió un 15.6% más a la varianza explicada y mostró un perfil nutricional rico en beta-carotenos (0.55) y vitamina C (0.30) y pobre en hierro (-0.47), retinoides (-0.39) y vitamina D (-0.37); lo que representaría un patrón basado en alimentos de origen vegetal y antioxidantes (ricos en vitamina C y beta-carotenos) y relativamente pobre en los de origen animal (ricos en retinol, vitamina D y hierro).

Este perfil se mantuvo prácticamente idéntico cuando se excluyeron los suplementos; excepto la asociación con el hierro que desapareció, se reforzaron ligeramente las otras correlaciones identificadas, lo que sugiere que es un perfil que responde al aporte procedente de la ingesta de alimentos. Además, la exclusión de la suplementación con hierro, que tuvo una relevancia especial en el análisis ya que apareció en todos los componentes extraídos, desenmascaró el aporte de fibra (0.21) como un factor a considerar en este perfil, lo que reforzaría que se trata de un perfil de ingesta basado en alimentos de origen vegetal, rico en fibra y antioxidantes.

El tercer perfil (PN3) se caracterizó por una ingesta elevada de hierro (0.63) y tiamina (0.20) y baja en vitamina D (-0.44), retinoides (-0.38) y beta-carotenos (-0.28). Sin embargo, cuando se obvió el aporte debido a los suplementos, el perfil cambió significativamente con una correlación positiva con el aporte de colesterol (0.27), AGS (0.22), beta-carotenos (0.51) y retinoides (0.50). Así mismo el perfil presentó correlación negativa con el aporte de vitaminas D (-0.29), C (-0.27) y E (-0.23) y fibra (-0.26) lo que reflejaría una ingesta más bien rica en alimentos de origen animal.

El cuarto y último componente (PN4) respondió a una ingesta enriquecida en beta-carotenos (0.65) y hierro (0.45) en respuesta a la suplementación recibida como se ha indicado anteriormente, por lo que cuando se retiró el aporte de los suplementos, éste perfil se caracterizó

por ser rico en vitamina B6 (0.30), retinoides (0.45) y vitamina C (0.43) en detrimento de la ingesta de almidón (-0.30).

En resumen, el primer perfil refleja la ingesta de vitamina D, folatos y vitaminas del grupo B que recibieron las madres en forma de suplementos y que supuso la mayor variabilidad en la ingesta de nutrientes en la población estudiada. El segundo perfil resumió la ingesta de alimentos de origen vegetal ricos en antioxidantes y fibra; el tercero puso de manifiesto el consumo de alimentos de origen animal y el cuarto perfil no nos aportó una información que pudiéramos interpretar con un sentido nutricional.

Así, en la población estudiada la extracción de componentes descriptivos del perfil nutricional resultó similar a la obtenida en población europea en cuanto al número de componentes extraídos, la varianza explicada (70-71% en el presente estudio frente al 67% presentado en el estudio EPIC) y los perfiles descritos (235).

4.2.4.2 Patrones de ingesta de alimentos

El análisis factorial también se llevó a cabo por grupos de alimentos consumidos con el objetivo de reflejar los hábitos de consumo alimentario.

Siguiendo la metodología descrita (capítulo 3.5.6.2), se identificaron dos patrones de consumo de alimentos que explicaron un 31.2% de la variabilidad muestral. La Tabla 4.14 presenta los patrones de ingesta de alimentos identificados (PA1 y PA2) y los coeficientes de correlación para cada uno de los grupos de alimentos dentro de cada patrón. Para su interpretación se consideraron aquellos alimentos con autovalores mayores a ± 0.4 , en verde y rojo para cada signo respectivamente.

Variables	PA1	PA2
Cereales	0.20	0.44
Legumbres	0.25	-0.24
Vegetales	-0.26	-0.38
Frutas y frutos secos	0.18	-0.40
Lacteos	0.41	0.07
Carnicos	-0.50	0.24
Pescados	0.34	-0.21
Huevos	0.07	-0.35
Azucares	0.15	0.07
Aceites	-0.38	-0.32
Bebidas	-0.14	-0.08
Precocinados	-0.22	0.15
Aperitivos	0.12	0.26
Salsas	0.10	-0.07
Varianza acumulada explicada (%)	16.03	31.17

Tabla 4.14 Matriz de coeficientes de correlación y porcentaje de la varianza explicada por cada componente extraído. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó considerando el aporte de sobre 14 grupos de alimentos que reúnen los hábitos alimentarios de la población estudiada. Se propuso como criterio descriptivo para cada perfil aquellos nutrientes con coeficientes de correlación mayores a ± 0.4 en verde y rojo respectivamente para cada signo.

El primer patrón (PA1) identificado respondió a un consumo rico de productos lácteos (0.41) pero pobre en alimentos cárnicos y sus derivados (-0.50). Este componente explicó un 16.0% de la varianza total explicada.

El segundo patrón (PA2) describió una ingesta rica en cereales (0.44) pero pobre en frutas y frutos secos (-0.40). Éste contó con un 15.1% adicional de la varianza total explicada.

En resumen, encontramos dos patrones de ingesta representativos e interpretables con los que poder trabajar en la identificación de fuentes alimentarias con potencial influencia sobre la composición de la leche materna y sobre el crecimiento infantil hacia el capítulo 4.4.

4.2.5 Diferencias en las ingestas por grupos de estudio

Tras la valoración nutricional de la población estudiada, analizamos las diferencias observadas por grupos en base a los factores de interés del estudio. Así, observamos que no hubo diferencias para la ingesta de ningún nutriente en base al sexo del lactante mientras que sí se observaron diferencias significativas asociadas al IMC materno (Tablas 4.4 a 4.12).

La ingesta calórica no presentó diferencias entre grupos asociadas al IMC materno ni tampoco lo hizo la contribución energética de la ingesta de proteínas, pero la obesidad materna se asoció a diferencias cualitativas en el patrón alimentario definido por las proporciones de lípidos y azúcares.

Concretamente, el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) fue menor en las madres con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ($19.0 \pm 3.8\%$) en comparación con aquellas con un $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ($21.4 \pm 3.9\%$) ($p=0.023$). Así mismo, los porcentajes de AG poliinsaturados Omega 6 ($p=0.044$) y Omega 3 ($p=0.029$) presentaron el mismo patrón diferencial asociado al IMC materno, con una proporción mayor de ingesta de ambos en mujeres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (Tabla 4.4).

La mayor proporción en la ingesta de los distintos tipos de AG se contrarrestó con una contribución menor de los azúcares que supusieron un $17.6 \pm 4.0\%$ en mujeres con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ frente al $14.4 \pm 4.5\%$ si su $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ($p=0.009$).

Las diferencias observadas en los porcentajes de azúcares también fueron significativas en la aproximación cuantitativa del aporte diario de este grupo de nutrientes. Más específicamente, las mujeres con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ingirieron $94.9 \pm 30.9 \text{ g/día}$ de azúcares totales frente a los $75.4 \pm 25.2 \text{ g/día}$ en las mujeres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ($p=0.012$). Además, estas diferencias se relacionaron con la ingesta de sacarosa ($p=0.028$), glucosa ($p=0.012$) y fructosa ($p=0.028$), que resultaron distintas entre grupos por IMC materno (Tabla 4.8).

Siguiendo con los hidratos de carbono, se observó un efecto interacción entre los factores de interés (sexo del lactante x IMC materno) sobre la ingesta de carbohidratos totales ($p=0.013$) y almidón ($p=0.012$). Así, las madres que tuvieron una niña con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ingirieron cantidades mayores de ambos nutrientes en comparación con las madres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$, mientras que las que tuvieron un niño con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ingirieron cantidades menores en comparación con las madres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$.

En relación a la evaluación en la ingesta de micronutrientes, se observaron diferencias significativas para la ingestas de vitaminas C ($p=0.003$), E ($p=0.043$) y tocoferoles totales ($p=0.048$) en relación al IMC materno, presentando ingestas más bajas las madres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$. Las diferencias para la vitamina E vinieron de la mano de la suplementación

recibida, ya que al no tenerla en cuenta, esta diferencia desapareció entre grupos por IMC materno (Tabla 4.10).

En cuanto a las ingestas de minerales, observamos diferencias significativas para las ingestas de hierro ($p=0.042$) y cloro ($p=0.049$) (Tabla 4.11). Mientras que las mujeres con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ingirieron mayores cantidades de hierro y menores de cloro, las mujeres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ recibieron menos suplementos de hierro pero sus ingestas de cloro fueron superiores significativamente, lo cual se asoció a un consumo más elevado de sal, cereales de desayuno y salsas (datos no mostrados).

En lo relativo a la ingesta de componentes bioactivos, se observaron diferencias significativas en la ingesta de fitoesteroles vegetales ($p=0.001$) en función del IMC materno presentando ingestas más bajas las madres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$, incluyendo el betasitosterol ($p=0.014$), el estigmasterol ($p=0.020$) y el campesterol ($p=0.011$). Además la ingesta de fosfatidilcolina presentó un efecto interacción entre los factores de interés ($p=0.032$), con ingestas más bajas en mujeres que tuvieron una niña con un $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ en comparación con las de $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ y al revés en las mujeres que tuvieron un niño, con mayores ingestas asociadas a un $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$. Para el resto de compuestos bioactivos no se obtuvieron diferencias significativas entre grupos por variables de interés.

Finalmente se evaluó la adherencia por IMC materno y sexo del lactante a los perfiles nutricionales y patrones de ingesta por grupos de alimentos descritos en el capítulo anterior. En este contexto se destacaría el perfil nutricional que tuvo en cuenta la suplementación con micronutrientes. Concretamente, las madres con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ se adhirieron mejor a dicho componente con una puntuación promedio de 0.24, mientras que las madres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ obtuvieron una puntuación promedio de -0.43. Ello pone en relieve una ingesta más rica en vitaminas del grupo B y ácido fólico en madres con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ en comparación con las madres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (datos no mostrados).

4.3 Caracterización de la leche materna y evolución durante los primeros tres meses de lactancia

4.3.1 Evolución de la composición en lípidos: triglicéridos, ácidos grasos no esterificados y perfil de ácidos grasos individuales

4.3.1.1 Concentración de triglicéridos y ácidos grasos no esterificados

La media poblacional para la concentración de triglicéridos en leche fue de 3.07 ± 1.29 , 2.97 ± 1.49 y 2.76 ± 1.63 g/100mL, para los meses 1, 2 y 3, respectivamente de lactancia (Tabla 4.15). No se observaron diferencias significativas entre meses ni tampoco asociado al IMC materno o al sexo del lactante, tal como se ha descrito recientemente (336).

(g/100mL)	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
Mes 1	N=53	N=35	N=18		N=29	N=24		N=21	N=8	N=14	N=10	
TG	3.07 (1.29)	2.90 (1.16)	3.40 (1.49)	0.231	3.11 (1.33)	3.02 (1.26)	0.795	2.98 (1.19)	3.46 (1.68)	2.79 (1.15)	3.35 (1.40)	0.906
AGNE	0.28 (0.10)	0.28 (0.09)	0.28 (0.11)	0.933	0.28 (0.11)	0.28 (0.08)	0.978	0.29 (0.09)	0.25 (0.13)	0.27 (0.09)	0.30 (0.08)	0.268
Mes 2	N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=22	N=7	N=14	N=12	
TG	2.97 (1.49)	3.12 (1.52)	2.67 (1.42)	0.275	2.75 (1.34)	3.21 (1.63)	0.257	2.80 (1.44)	2.58 (1.00)	3.63 (1.55)	2.72 (1.65)	0.427
AGNE	0.26 (0.09)	0.27 (0.09)	0.22 (0.08)	0.048	0.24 (0.08)	0.28 (0.09)	0.097	0.24 (0.09)	0.22 (0.05)	0.32 (0.08)	0.23 (0.09)	0.227
Mes 3	N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=21	N=8	N=15	N=11	
TG	2.76 (1.63)	2.58 (1.70)	3.09 (1.47)	0.257	2.77 (1.52)	2.74 (1.77)	0.946	2.68 (1.57)	3.01 (1.45)	2.45 (1.91)	3.14 (1.55)	0.703
AGNE	0.24 (0.11)	0.23 (0.10)	0.25 (0.14)	0.592	0.22 (0.09)	0.25 (0.13)	0.332	0.23 (0.08)	0.22 (0.13)	0.24 (0.11)	0.27 (0.15)	0.515

Tabla 4.15 Concentración de triglicéridos (TG) y ácidos grasos no esterificados (AGNE) en leche en los tres primeros meses de lactancia y el promedio de las tres determinaciones. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

La concentración de lípidos totales en leche humana se sitúa en el rango de 0.5-7g/100mL (94, 337, 338), donde un 83.7% lo constituyen los di- y triglicéridos, si bien otras fuentes indican que los triglicéridos pueden constituir hasta el 98% del total lipídico (339, 340). Recientemente se ha descrito un contenido total de grasa en leche madura de 3.06 ± 1.29 g/100mL en una cohorte de Barcelona y del mismo orden en una cohorte Italiana. Así pues, los resultados obtenidos en la población de estudio durante los primeros tres meses de lactancia encajan con estas cifras (341).

El contenido en grasa de la leche materna es el macronutriente más variable cambiando según la etapa de lactancia, a lo largo de un día e incluso dentro de una misma toma (342). Aunque se ha postulado una influencia importante de la dieta sobre el tipo de ácidos grasos (59), también hay evidencias de que la dieta no influye demasiado en la cantidad de grasa de la leche (340).

Los efectos de la dieta sobre la composición de la leche materna se evalúan con detalle más adelante y no se ha observado una influencia de la ingesta calórica ni de los lípidos totales sobre la concentración de triglicéridos en leche, tal y como ha sido previamente descrito (340). Sin embargo, sí aparecen correlaciones entre la calidad de la grasa dietética y el perfil lipídico lácteo que se detallan en el capítulo 4.4.1.

En cuanto a la evolución, se ha descrito que el contenido en grasa total aumenta a medida que avanza la lactancia desde el calostro y durante la transición a la leche madura, pasando de 2 a 4.5g/100mL y una vez alcanzado este punto, el contenido graso se mantiene constante. De manera similar, se han publicado resultados para la concentración de grasa en leche humana entre los meses primero y sexto tras el parto sin observarse diferencias (343). Los resultados sobre la concentración de triglicéridos obtenidos en la población estudiada durante los tres primeros meses de lactancia reflejan esta tendencia a la constancia. Sin embargo, recientemente se han presentado resultados mostrando que durante los primeros dos meses de lactancia materna se manifiesta un incremento de la concentración de TG en detrimento de los fosfolípidos y el colesterol (340, 344), por lo que la situación aún es controvertida.

La evaluación del efecto de los factores de confusión indicó la presencia de concentraciones más altas de TGs en leche de madres que parieron bebés pequeños para su edad gestacional en comparación con los que presentaron un peso adecuado para su edad gestacional ($p=0.023$) a lo largo del periodo de lactancia materna ensayado (datos no mostrados). Estos resultados van en línea con las diferencias descritas entre nacimientos pre- vs a término (338, 345), aunque en nuestro caso, el efecto se observa asociado al tamaño para la edad gestacional pero no para la edad gestacional de forma independiente.

Además de los triglicéridos y la pequeña cantidad de di- y monoglicéridos que constituyen casi toda la fracción lipídica, también encontramos en la leche humana fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos no esterificados. En este estudio hemos determinado la concentración de ácidos grasos no esterificados, por su interés como potenciales moduladores de la programación metabólica (142). La media poblacional fue de 0.28 ± 0.10 , 0.26 ± 0.09 y 0.24 ± 0.11 g/100mL para cada uno de los meses respectivamente (Tabla 4.15). De modo que tal y como ocurre con los triglicéridos, no se observaron cambios significativos en la evolución de la concentración de AGNE durante los 3 primeros meses de lactancia. Los datos disponibles en la bibliografía para esta fracción de compuestos lipídicos en leche humana son escasos y aunque no está claro, la fracción de AGNE parece suponer como máximo un 3% del contenido lipídico de la leche materna (346),(340).

Al evaluar la influencia de los factores de interés, los resultados obtenidos al segundo mes de lactancia presentaron valores inferiores de AGNE en leches de madres con $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$ respecto de mujeres con normopeso (Tabla 4.15, $p=0.048$).

4.3.1.2 Perfil de ácidos grasos individuales

Se identificaron un total de 41 ácidos grasos y su abundancia relativa se detalla en la Tabla 4.16 para cada uno de los meses estudiados.

		Total	Mes 1	Mes 2	Mes 3	p-valor													
(%)		N=162	N=53	N=54	N=55	Tiempo	IMC	TP	PP	TL	GPE	Etnia	EM	EG	Pre/post término	TEG	CS	EP	
C80	Caprílico	1.93 (2.24)	1.75 (1.43)	1.98 (3.04)	2.05 (1.96)														0.004
C100	Cáprico	2.36 (0.68)	2.51 (0.65)	2.32 (0.64)	2.26 (0.73)		0.005			0.014		0.049							
C120	Láurico	7.77 (2.90)	7.96 (2.64)	7.53 (2.92)	7.81 (3.14)		0.000			0.019	0.003							0.044	
C140	Mirístico	6.25 (2.28)	6.03 (1.86)	6.19 (2.34)	6.53 (2.59)		0.000			0.028	0.017	0.024							
<i>Cadena media</i>		<i>18.3 (6.27)</i>	<i>18.2 (5.17)</i>	<i>18.0 (6.34)</i>	<i>18.7 (7.20)</i>		0.000				0.004								
C150	Pentadecanoico	0.22 (0.09)	0.21 (0.07)	0.23 (0.10)	0.22 (0.09)							0.017							
C160	Palmitico	20.2 (2.40)	20.2 (2.51)	20.3 (2.17)	20.1 (2.53)								0.044	0.048					
C170	Heptadecanoico	0.21 (0.04)	0.21 (0.04)	0.22 (0.04)	0.21 (0.04)		0.029					0.005		0.040					
C180	Esteárico	4.76 (0.83)	4.76 (0.82)	4.80 (0.77)	4.73 (0.90)														
C190	Ácido nonadecanoico	0.09 (0.04)	0.09 (0.04)	0.09 (0.03)	0.09 (0.04)				0.006				0.031						
C200	Araquídico	0.11 (0.08)	0.13 (0.13)	0.11 (0.04)	0.10 (0.03)			0.006											
C210	Heneicosanoico	0.21 (0.07)	0.26 (0.09)	0.20 (0.05)	0.18 (0.04)	0.000		0.000	0.016			0.013							0.012
C220	Behénico	0.03 (0.08)	0.04 (0.13)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)			0.023											
C230	Tricosanoico	0.03 (0.04)	0.04 (0.06)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.027		0.012											
C240	Lignocérico	0.02 (0.06)	0.03 (0.10)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)			0.018											
<i>Saturados</i>		<i>44.2 (6.27)</i>	<i>44.2 (5.22)</i>	<i>44.0 (6.14)</i>	<i>44.3 (7.34)</i>		0.000			0.019	0.016	0.008							
C141n5	Miristoleico	0.17 (0.08)	0.16 (0.06)	0.18 (0.09)	0.18 (0.09)														
C151n5	cis-10-Pentadecenoico	0.05 (0.02)	0.04 (0.02)	0.05 (0.02)	0.05 (0.03)	0.035						0.014							

Código	Ácido Graso	Total N=162	Mes 1 N=53	Mes 2 N=54	Mes 3 N=55	p-valor													
						Tiempo	IMC	TP	PP	TL	GPE	Etnia	EM	EG	Pre/post término	TEG	CS	EP	
C161n9	Hexadecenoico	0.46 (0.13)	0.47 (0.15)	0.46 (0.10)	0.46 (0.14)		0.009												
C161n7	cis-9-Palmitoleico	1.88 (0.60)	1.93 (0.64)	1.92 (0.63)	1.81 (0.52)				0.002		0.000								
C171n7	cis-10-Heptadecenoico	0.14 (0.03)	0.14 (0.04)	0.15 (0.03)	0.14 (0.03)				0.027			0.011							
C181n9	Oleico	34.7 (5.53)	34.6 (4.88)	34.7 (5.91)	34.9 (5.82)		0.000		0.027	0.003		0.000							
C181n7	cis-Vaccénico	1.74 (0.43)	1.84 (0.61)	1.70 (0.32)	1.68 (0.28)				0.001		0.034								
C201n9	cis-11-Eicosenoico	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.02 (0.02)	0.02 (0.01)														
C221n11	Cetoleico	0.03 (0.02)	0.03 (0.02)	0.03 (0.01)	0.03 (0.02)												0.005	0.007	0.002
C221n9	Erúcido	0.02 (0.02)	0.03 (0.04)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.041		0.005										0.036	
<i>Monoinsaturados</i>		<i>39.0 (6.58)</i>	<i>38.6 (7.42)</i>	<i>39.3 (6.36)</i>	<i>39.2 (6.00)</i>		0.000		0.007	0.006		0.000							
C162n4	Palmitolinoleico	0.00 (0.01)	0.00 (0.01)	0.00 (0.01)	0.00 (0.01)														
C182n6	Linoléico	14.3 (3.97)	14.1 (4.41)	14.4 (3.71)	14.2 (3.84)			0.011	0.000				0.042						
C183n6	γ -Linolénico	0.12 (0.05)	0.12 (0.05)	0.13 (0.05)	0.11 (0.04)									0.001					
C183n3	α -Linolénico	0.58 (0.31)	0.54 (0.31)	0.62 (0.26)	0.59 (0.35)													0.037	
C184n3	Estearidónico	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)		0.017												
C203n6	Dihomo- γ -linolénico	0.31 (0.24)	0.38 (0.39)	0.29 (0.09)	0.25 (0.06)	0.011												0.003	
C204n6	Araquidónico	0.33 (0.07)	0.36 (0.07)	0.33 (0.07)	0.30 (0.06)	0.000													
C204n3	Eicosatetraenoico	0.08 (0.04)	0.09 (0.05)	0.07 (0.02)	0.07 (0.03)	0.002		0.047											
C205n3	EPA	0.05 (0.05)	0.05 (0.05)	0.05 (0.04)	0.05 (0.06)														

Código	Acido	Total N=162	Mes 1 N=53	Mes 2 N=54	Mes 3 N=55	p-valor												
						Tiempo	IMC	TP	PP	TL	GPE	Etnia	EM	EG	Pre/post término	TEG	CS	EP
C225n3	DPA	0.05 (0.02)	0.06 (0.03)	0.05 (0.02)	0.05 (0.02)													
C226n3	DHA	0.15 (0.08)	0.17 (0.10)	0.14 (0.07)	0.14 (0.07)						0.029	0.033						
<i>Poliinsaturados</i>		<i>16.0 (4.06)</i>	<i>15.9 (4.48)</i>	<i>16.1 (3.77)</i>	<i>15.9 (3.98)</i>			0.010	0.001									
<i>Omega 6</i>		<i>15.0 (4.01)</i>	<i>15.0 (4.44)</i>	<i>15.2 (3.77)</i>	<i>14.9 (3.87)</i>			0.010	0.000				0.047					
<i>Omega 3</i>		<i>0.94 (0.40)</i>	<i>0.93 (0.40)</i>	<i>0.96 (0.32)</i>	<i>0.94 (0.46)</i>						0.021						0.048	
<i>Ratio Omega 6 / Omega 3</i>		<i>17.9 (7.36)</i>	<i>18.2 (7.77)</i>	<i>17.6 (7.86)</i>	<i>18.0 (6.52)</i>		0.040	0.050	0.000		0.028							
<i>Ratio AA / DHA</i>		<i>2.63 (1.10)</i>	<i>2.59 (1.05)</i>	<i>2.74 (1.19)</i>	<i>2.56 (1.07)</i>				0.000		0.001	0.043						
<i>Ratio C17:0/C21:0</i>		<i>1.09 (0.38)</i>	<i>0.90 (0.37)</i>	<i>1.15 (0.37)</i>	<i>1.21 (0.33)</i>	0.000	0.000	0.004	0.013									0.016
C181n11t	trans-7-Octadecenoico	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.01 (0.02)	0.01 (0.01)													
C181n9t	Elaídico	0.15 (0.13)	0.17 (0.15)	0.15 (0.14)	0.14 (0.08)													
C182n6tt	Linoelaídico	0.04 (0.02)	0.04 (0.02)	0.04 (0.02)	0.04 (0.02)						0.007	0.016						
<i>Trans</i>		<i>0.19 (0.14)</i>	<i>0.20 (0.17)</i>	<i>0.19 (0.16)</i>	<i>0.18 (0.10)</i>													
c9t11CLA	Ruménico	0.09 (0.03)	0.09 (0.03)	0.09 (0.03)	0.10 (0.04)						0.007	0.001						
t10c12CLA	10,12-CLA	0.02 (0.02)	0.02 (0.01)	0.02 (0.02)	0.03 (0.03)					0.019						0.001		
?	no identificado	0.26 (0.08)	0.29 (0.06)	0.25 (0.05)	0.25 (0.12)	0.010		0.043								0.000		

Tabla 4.16 Ácidos grasos individuales (%) expresados en relación al total identificado por cromatografía de gases, ratios y sumatorios de los grupos considerados relevantes en leche materna durante los primeros tres meses consecutivos tras el parto. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar. Ácidos grasos de cadena media (AGCM), saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI), poliinsaturados (AGPI), Omega 6 (linoléico+gamma-linolénico+dihomo-gamma-linolénico+araquidónico), Omega 3 (alfa-linolénico+estearidónico+eicosatetraenoico+EPA+DPA) y Trans (trans-7-Octadecenoico+elaídico+linoelaídico). A partir de los

datos individuales, se han calculado los ratios Omega 6/Omega 3 y ácido araquidónico (AA)/ ácido docosahexaenoico (DHA). El análisis estadístico se ha realizado mediante ANOVA de medidas repetidas. Se incluye el análisis por modelo lineal mixto para la evaluación longitudinal del efecto de los factores IMC materno y sexo del lactante, así como los potenciales efectos de factores de confusión (tipo de parto (TP), partos previos (PP), edad gestacional (EG), nacimientos pre-/post- o a término, tamaño para la edad gestacional (TEG), consumo de suplementos (CS), estación del parto (EP), tipo de lactancia (TL), ganancia de peso durante el embarazo (GPE), etnia y edad materna (EM)). El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$. No se muestran los resultados que no alcanzaron significancia estadística.

Evolución de la proporción de AG durante los tres primeros meses de lactancia

La proporción promedio de AG en leche de los tres primeros meses de lactancia fue de un $44.2 \pm 6.3\%$ de AGS, un $39.0 \pm 6.6\%$ de AGMI y un $16.0 \pm 4.1\%$ de AGPI. El análisis comparativo de estudios en poblaciones geográficamente cercanas (339, 343, 347-350) muestra que el rango para los AGS es 38.5-45.7%, para los AGMI es de 33.2-47.4% y para los AGPI el rango oscila entre 13.2-19.7%. Los resultados de la población estudiada en los tres meses se situaron dentro de dichos rangos.

El ratio AA/DHA resultó mayor en la población de estudio lo cual fue reflejo de una menor proporción de AA frente al DHA con respecto a otras poblaciones (339, 348, 350). De hecho, la proporción de AA ($0.33 \pm 0.07\%$) fue inferior al rango ideal (0.35-1.00%) definido por paneles de expertos a nivel internacional teniendo en cuenta su importante función en el crecimiento y desarrollo cerebral durante el periodo perinatal (351). Por otra parte, el DHA presentó una proporción promedio mayor ($0.15 \pm 0.08\%$) a la considerada habitual en mujeres cuya dieta no incluye DHA en cantidades altas ni toman suplementos con DHA (0.05-0.10%), pero no alcanzó niveles de hasta el 1% que pueden encontrarse en mujeres con consumo habitual de pescado azul (1 vez a la semana) o suplementos (343).

En relación a los cambios evolutivos con la lactancia, no se identificaron diferencias en la proporción de los grupos de ácidos grasos a lo largo de los tres meses estudiados, si bien, se observaron diferencias significativas para los siguientes ácidos grasos: el heneicosanoico (C21:0) y el tricosanoico (C23:0) entre los saturados; el ácido cis-10-pentadecenoico (C15:1n5) y el erúxico (C22:1n9) entre los AGMI; el dihomo- γ -linolénico (C20:3n6), el AA (C20:4n6) y eicosatetraenoico (C20:4n3) entre los AGPI. A excepción del C15:1n5, todos disminuyeron significativamente entre el primer y el tercer mes de lactancia.

La bibliografía relacionada suele mostrar cambios evolutivos en el proceso de maduración de la leche materna desde el calostro, particularmente en la comparación de los primeros días de vida con la leche madura de tres o cuatro semanas post-parto. Siendo menos estudiada la composición en AG a lo largo de los 3 primeros meses de vida.

Se ha descrito que los AG esenciales, linoleico (C18:2n6) y alfa-linolénico (C18:3n3), experimentan un aumento relativo durante el primer año de lactancia, mientras que el AA y el DHA se mantienen constantes. Sin embargo, los ácidos AA y DHA experimentan un aumento desde el inicio de la lactancia hacia el primer mes para luego disminuir hacia el tercer mes (340). Nuestros resultados no reflejaron dicho perfil evolutivo al mantenerse constantes los AG esenciales y el DHA simultáneamente a una disminución significativa del AA, aunque debemos puntualizar que el marco temporal estudiado es de tan solo tres meses de lactancia en nuestro

caso. Si bien, el mismo perfil observado en la población estudiada ha sido descrito en población griega y portuguesa durante los primeros seis y cuatro meses de lactancia respectivamente (343, 350).

En 2015, un estudio del metaboloma más completo hasta la fecha conocido de la leche materna muestra un aumento de los ácidos grasos caprílico (C8:0), cáprico (C10:0) y láurico (C12:0) entre los AGCM acompañado de un aumento del ácido palmítico (C16:0) entre los AGS, así como del hexadecenoico (C16:1n9), palmitoleico (C16:1n7) y oleico (C18:1n9) entre los AGMI en el transcurso desde 1-5 días hasta los 80 días de lactancia (2-3 meses tras el parto). Así mismo, se identificó una disminución del total de ácidos grasos poliinsaturados a pesar de que los ácidos linoleico (C18:2n6), linoeláídico (C18:2n6tt) y AA (C20:4n6) aumentaron significativamente (344).

Teniendo en consideración la bibliografía, nuestros resultados describieron un perfil de AG con ciertas similitudes pero también diferencias. La tendencia evolutiva para la disminución progresiva del AA fue la observación que encajó con un mayor número de resultados observados por otros autores.

La relación C17:0/C21:0 en leche materna se ha propuesto como potencial biomarcador de la ingesta de dietas ricas en trigo (<0.2) o en centeno integrales (>0.2). Estos dos AG, junto con el C19:0, C23:0 y C25:0 son homólogos de los alkylresorcinoles (352). Los alkylresorcinoles son un conjunto de lípidos fenólicos de cadena larga presentes en los cereales integrales pero no en los refinados que se pueden utilizar como marcadores de la ingesta de cereales integrales en relación con la prevalencia de distintas enfermedades crónicas (353). En la población estudiada se obtuvo un ratio C17:0/C21:0 promedio de 1.09 ± 0.38 y mostró una evolución creciente durante los primeros tres meses de lactancia. Este resultado respondería a una dieta más rica en centeno que en trigo integral, lo cual encajaría con el consumo extendido de pan moreno en la población y cuya composición contiene un 50% de harina de centeno integral, sin embargo no encontramos correlaciones con la ingesta de cereales ni fibra (datos no mostrados).

Puesto que en este estudio no se identificó el C25:0 no ha sido posible presentar el sumatorio de todos los homólogos de los alkylresorcinoles tal y como suele presentarse en la bibliografía, además de que los resultados disponibles se refieren a porcentajes relativos del total de homólogos determinados, por lo que no sería posible comparar los resultados con la bibliografía disponible en unidades de concentración, habitualmente nmol/L (354).

Efecto del IMC materno y sexo del lactante

En relación al efecto de los factores de interés (Tabla 4.16), el sexo del lactante y el IMC materno, se observó una influencia notable del IMC materno sobre la composición en AGCM, AGS, AGMI y también para los ratios Omega 6/Omega 3, así como para el ratio C17:0/C21:0 en los primeros tres meses.

Específicamente, los ácidos grasos cáprico (C10:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), heptadecanoico (C17:0), hexadecenoico (C16:1n9), oleico (C18:1n9), y estearidónico (C18:4n3) presentaron evoluciones distintas de forma significativa asociadas al IMC materno.

El estudio del sexo del lactante no obtuvo influencias sobre la proporción de ácidos grasos en leche materna a excepción del ácido cis-10-heptadecenoico que presentó interacción entre ambos factores de interés (IMC x Sexo, $p=0.018$).

Tras el análisis longitudinal se estudiaron las diferencias en base a los factores de interés para cada uno de los meses en que se realizó la determinación del perfil de AG (Tablas 4.17-19).

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(%)		N=53	N=35	N=18		N=29	N=24		N=21	N=8	N=14	N=10	
C80	Caprílico	1.75 (1.43)	1.78 (1.62)	1.70 (0.98)	0.81	1.67 (1.17)	1.85 (1.71)	0.658	1.71 (1.30)	1.58 (0.79)	1.90 (2.06)	1.79 (1.15)	0.987
C100	Cáprico	2.51 (0.65)	2.41 (0.68)	2.70 (0.58)	0.109	2.46 (0.67)	2.56 (0.64)	0.592	2.42 (0.75)	2.58 (0.41)	2.40 (0.57)	2.79 (0.69)	0.560
C120	Láurico	7.96 (2.64)	7.24 (2.34)	9.35 (2.69)	0.008	7.91 (2.63)	8.01 (2.70)	0.884	7.32 (2.44)	9.44 (2.64)	7.12 (2.26)	9.27 (2.88)	0.982
C140	Mirístico	6.03 (1.86)	5.49 (1.56)	7.07 (1.97)	0.006	6.08 (1.82)	5.97 (1.94)	0.834	5.56 (1.51)	7.43 (1.96)	5.38 (1.70)	6.78 (2.04)	0.644
<i>Cadena media</i>		18.2 (5.17)	16.9 (4.71)	20.8 (5.16)	0.012	18.1 (5.16)	18.4 (5.29)	0.848	17.0 (4.80)	21.0 (5.20)	16.8 (4.75)	20.6 (5.41)	0.946
C150	Pentadecanoico	0.21 (0.07)	0.21 (0.08)	0.20 (0.05)	0.612	0.21 (0.08)	0.21 (0.07)	0.969	0.21 (0.09)	0.20 (0.05)	0.21 (0.07)	0.20 (0.06)	0.808
C160	Palmítico	20.2 (2.51)	19.9 (2.78)	20.6 (1.84)	0.267	20.2 (2.70)	20.1 (2.30)	0.942	20.1 (2.88)	20.3 (2.34)	19.6 (2.70)	20.9 (1.39)	0.462
C170	Heptadecanoico	0.21 (0.04)	0.21 (0.04)	0.20 (0.05)	0.446	0.21 (0.05)	0.20 (0.04)	0.518	0.22 (0.05)	0.19 (0.03)	0.20 (0.03)	0.21 (0.05)	0.122
C180	Esteárico	4.76 (0.82)	4.78 (0.95)	4.71 (0.49)	0.726	4.90 (0.88)	4.58 (0.71)	0.144	4.94 (0.98)	4.81 (0.55)	4.54 (0.87)	4.63 (0.46)	0.655
C190	Ácido nonadecanoico	0.09 (0.04)	0.09 (0.04)	0.10 (0.03)	0.377	0.10 (0.04)	0.08 (0.04)	0.345	0.09 (0.04)	0.10 (0.02)	0.08 (0.04)	0.10 (0.04)	0.405
C200	Araquídico	0.13 (0.13)	0.14 (0.16)	0.10 (0.02)	0.218	0.11 (0.02)	0.15 (0.20)	0.274	0.11 (0.02)	0.11 (0.02)	0.19 (0.25)	0.10 (0.03)	0.269
C210	Heneicosanoico	0.26 (0.09)	0.26 (0.10)	0.26 (0.05)	0.932	0.25 (0.06)	0.26 (0.11)	0.801	0.25 (0.07)	0.26 (0.05)	0.26 (0.14)	0.25 (0.05)	0.695
C220	Behénico	0.04 (0.13)	0.05 (0.16)	0.02 (0.01)	0.306	0.03 (0.01)	0.07 (0.20)	0.322	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.10 (0.26)	0.02 (0.00)	0.328
C230	Tricosanoico	0.04 (0.06)	0.04 (0.08)	0.03 (0.00)	0.331	0.03 (0.01)	0.05 (0.09)	0.353	0.03 (0.01)	0.03 (0.01)	0.06 (0.12)	0.03 (0.00)	0.405
C240	Lignocérico	0.03 (0.10)	0.04 (0.12)	0.02 (0.01)	0.251	0.02 (0.01)	0.05 (0.14)	0.289	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.07 (0.18)	0.02 (0.00)	0.372
<i>Saturados</i>		44.2 (5.22)	42.7 (4.64)	47.1 (5.17)	0.005	44.2 (5.14)	44.2 (5.44)	0.985	43.0 (4.73)	47.1 (5.29)	42.1 (4.62)	47.1 (5.35)	0.749
C141n5	Miristoleico	0.16 (0.06)	0.16 (0.07)	0.16 (0.05)	0.948	0.16 (0.07)	0.16 (0.05)	0.748	0.16 (0.07)	0.17 (0.05)	0.16 (0.06)	0.16 (0.05)	0.756

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(%)		N=53	N=35	N=18		N=29	N=24		N=21	N=8	N=14	N=10	
C151n5	cis-10-Pentadecenoico	0.04 (0.02)	0.04 (0.02)	0.04 (0.01)	0.878	0.04 (0.02)	0.05 (0.02)	0.38	0.04 (0.02)	0.04 (0.01)	0.05 (0.02)	0.04 (0.02)	0.896
C161n9	Hexadecenoico	0.47 (0.15)	0.49 (0.18)	0.45 (0.08)	0.273	0.49 (0.20)	0.46 (0.07)	0.446	0.51 (0.23)	0.42 (0.03)	0.45 (0.06)	0.47 (0.10)	0.243
C161n7	cis-9-Palmitoleico	1.93 (0.64)	1.88 (0.68)	2.02 (0.58)	0.45	1.79 (0.53)	2.10 (0.74)	0.097	1.71 (0.48)	1.99 (0.64)	2.14 (0.86)	2.04 (0.56)	0.325
C171n7	cis-10-Heptadecenoico	0.14 (0.04)	0.14 (0.04)	0.14 (0.04)	0.742	0.14 (0.04)	0.14 (0.04)	0.982	0.15 (0.04)	0.12 (0.02)	0.14 (0.03)	0.15 (0.05)	0.088
C181n9	Oleico	34.6 (4.88)	36.1 (4.34)	31.6 (4.55)	0.001	34.2 (4.17)	35.1 (5.68)	0.549	35.4 (3.85)	31.0 (3.33)	37.2 (4.95)	32.1 (5.47)	0.772
C181n7	cis-Vaccénico	1.84 (0.61)	1.79 (0.26)	1.94 (0.99)	0.548	1.85 (0.79)	1.84 (0.29)	0.942	1.74 (0.25)	2.12 (1.48)	1.87 (0.27)	1.79 (0.31)	0.211
C201n9	cis-11-Eicosenoico	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.03 (0.02)	0.431	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.552	0.02 (0.01)	0.03 (0.02)	0.02 (0.01)	0.02 (0.02)	0.398
C221n11	Cetoleico	0.03 (0.02)	0.03 (0.02)	0.03 (0.01)	0.639	0.03 (0.02)	0.03 (0.01)	0.599	0.03 (0.03)	0.03 (0.01)	0.03 (0.01)	0.04 (0.01)	0.371
C221n9	Erúcico	0.03 (0.04)	0.03 (0.04)	0.02 (0.01)	0.287	0.02 (0.02)	0.03 (0.05)	0.348	0.02 (0.02)	0.02 (0.01)	0.04 (0.06)	0.02 (0.01)	0.435
<i>Monoinsaturados</i>		38.6 (7.42)	39.6 (8.31)	36.4 (4.72)	0.081	38.8 (4.47)	38.3 (9.91)	0.822	39.8 (4.34)	36.0 (3.72)	39.3 (12.1)	36.8 (5.57)	0.759
C162n4	Palmitolinoleico	0.00 (0.01)	0.00 (0.01)	0.00 (0.00)	0.477	0.00 (0.01)	0.00 (0.01)	0.567	0.00 (0.01)	0.00 (0.01)	0.01 (0.01)	0.00 (0.00)	0.326
C182n6	Linoléico	14.1 (4.41)	14.1 (4.79)	14.2 (3.68)	0.969	14.5 (4.85)	13.7 (3.84)	0.464	14.6 (5.32)	14.5 (3.64)	13.5 (3.94)	13.9 (3.89)	0.843
C183n6	γ-Linolénico	0.12 (0.05)	0.12 (0.05)	0.12 (0.05)	0.741	0.12 (0.05)	0.12 (0.05)	0.713	0.12 (0.05)	0.11 (0.04)	0.11 (0.04)	0.12 (0.06)	0.561
C183n3	α-Linolénico	0.54 (0.31)	0.57 (0.35)	0.47 (0.18)	0.189	0.56 (0.37)	0.51 (0.22)	0.57	0.59 (0.42)	0.49 (0.17)	0.55 (0.24)	0.46 (0.20)	0.962
C184n3	Estearidónico	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.324	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.226	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.03 (0.02)	0.02 (0.01)	0.361
C203n6	Dihomo-γ-linolénico	0.38 (0.39)	0.40 (0.47)	0.35 (0.10)	0.56	0.43 (0.52)	0.32 (0.09)	0.289	0.46 (0.60)	0.35 (0.09)	0.30 (0.09)	0.35 (0.10)	0.492
C204n6	Araquidónico	0.36 (0.07)	0.35 (0.07)	0.37 (0.06)	0.313	0.37 (0.08)	0.35 (0.06)	0.281	0.36 (0.08)	0.38 (0.06)	0.33 (0.06)	0.36 (0.07)	0.735

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(%)		N=53	N=35	N=18		N=29	N=24		N=21	N=8	N=14	N=10	
C204n3	Eicosatetraenoico	0.09 (0.05)	0.10 (0.06)	0.08 (0.03)	0.288	0.09 (0.03)	0.10 (0.08)	0.74	0.09 (0.02)	0.10 (0.03)	0.11 (0.10)	0.08 (0.02)	0.194
C205n3	EPA	0.05 (0.05)	0.05 (0.06)	0.05 (0.04)	0.866	0.05 (0.03)	0.05 (0.07)	0.789	0.04 (0.02)	0.07 (0.05)	0.07 (0.09)	0.03 (0.01)	0.023
C225n3	DPA	0.06 (0.03)	0.06 (0.03)	0.06 (0.03)	0.701	0.06 (0.03)	0.05 (0.03)	0.53	0.05 (0.02)	0.07 (0.04)	0.06 (0.04)	0.05 (0.01)	0.129
C226n3	DHA	0.17 (0.10)	0.17 (0.10)	0.17 (0.11)	0.971	0.18 (0.10)	0.15 (0.10)	0.269	0.17 (0.08)	0.22 (0.14)	0.17 (0.12)	0.13 (0.05)	0.103
<i>Poliinsaturados</i>		15.9 (4.48)	16.0 (4.84)	15.9 (3.81)	0.933	16.4 (4.92)	15.3 (3.90)	0.377	16.5 (5.39)	16.3 (3.68)	15.2 (3.93)	15.5 (4.07)	0.859
<i>Omega 6</i>		15.0 (4.44)	15.0 (4.79)	15.0 (3.80)	0.992	15.4 (4.84)	14.4 (3.94)	0.405	15.5 (5.28)	15.3 (3.75)	14.2 (4.01)	14.7 (4.02)	0.789
<i>Omega 3</i>		0.93 (0.40)	0.97 (0.45)	0.86 (0.28)	0.265	0.96 (0.43)	0.89 (0.37)	0.532	0.96 (0.48)	0.97 (0.30)	0.99 (0.43)	0.76 (0.24)	0.332
<i>Ratio Omega 6 / Omega 3</i>		18.2 (7.77)	17.6 (7.67)	19.3 (8.05)	0.457	17.9 (7.70)	18.5 (8.01)	0.8	18.0 (7.48)	17.6 (8.79)	16.9 (8.20)	20.6 (7.61)	0.384
<i>Ratio AA / DHA</i>		2.59 (1.05)	2.53 (1.07)	2.70 (1.03)	0.564	2.41 (1.00)	2.81 (1.09)	0.172	2.51 (1.04)	2.14 (0.87)	2.56 (1.15)	3.16 (0.96)	0.119
<i>Ratio C17:0/C21:0</i>		0.90 (0.37)	0.95 (0.43)	0.80 (0.18)	0.084	0.93 (0.44)	0.87 (0.26)	0.569	0.99 (0.50)	0.76 (0.18)	0.89 (0.31)	0.84 (0.18)	0.433
C181n11t	trans-7-Octadecenoico	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.488	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.388	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.171
C181n9t	Eláidico	0.17 (0.15)	0.17 (0.17)	0.17 (0.10)	0.844	0.19 (0.19)	0.14 (0.07)	0.219	0.20 (0.21)	0.16 (0.12)	0.12 (0.05)	0.17 (0.08)	0.304
C182n6tt	Linoeláidico	0.04 (0.02)	0.04 (0.02)	0.04 (0.02)	0.777	0.05 (0.02)	0.04 (0.02)	0.198	0.05 (0.02)	0.04 (0.02)	0.03 (0.03)	0.04 (0.02)	0.427
<i>Trans</i>		0.20 (0.17)	0.21 (0.18)	0.19 (0.13)	0.62	0.23 (0.20)	0.16 (0.10)	0.103	0.25 (0.22)	0.19 (0.15)	0.15 (0.08)	0.19 (0.12)	0.260
c9t11CLA	Ruménico	0.09 (0.03)	0.09 (0.03)	0.09 (0.02)	0.962	0.09 (0.03)	0.09 (0.02)	0.585	0.09 (0.03)	0.08 (0.03)	0.08 (0.02)	0.09 (0.02)	0.376
t10c12CLA	10,12-CLA	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.269	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.879	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.088
?	no identificado	0.29 (0.06)	0.30 (0.07)	0.28 (0.06)	0.207	0.29 (0.05)	0.29 (0.07)	0.806	0.29 (0.05)	0.29 (0.06)	0.31 (0.08)	0.27 (0.06)	0.307

Tabla 4.17 Concentración de ácidos grasos individuales (% relativo al total identificado) en leche al primer mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. Cuando fue necesario se aplicó análisis post-hoc de Tukey y si se obtuvieron diferencias inter-grupales, éstas se señalaron mediante letras como superíndices. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(%)		N=54	N=36	N=18		N=29	N=25		N=22	N=7	N=14	N=11	
C80	Caprílico	1.98 (3.04)	1.63 (1.95)	2.69 (4.49)	0.351	1.81 (2.11)	2.18 (3.89)	0.671	1.86 (2.39)	1.64 (0.86)	1.26 (0.87)	3.35 (5.71)	0.205
C100	Cáprico	2.32 (0.64)	2.18 (0.53)	2.60 (0.75)	0.042	2.22 (0.53)	2.43 (0.74)	0.262	2.15 (0.54)	2.47 (0.46)	2.23 (0.54)	2.68 (0.90)	0.731
C120	Láurico	7.53 (2.92)	6.67 (2.20)	9.26 (3.43)	0.007	7.03 (2.35)	8.12 (3.41)	0.184	6.51 (2.19)	8.64 (2.24)	6.91 (2.28)	9.66 (4.07)	0.703
C140	Mirístico	6.19 (2.34)	5.51 (1.76)	7.54 (2.79)	0.01	5.66 (1.67)	6.80 (2.84)	0.086	5.29 (1.60)	6.80 (1.46)	5.85 (2.00)	8.01 (3.37)	0.612
<i>Cadena media</i>		18.0 (6.34)	16.0 (4.58)	22.1 (7.47)	0.004	16.7 (4.76)	19.5 (7.60)	0.118	15.8 (4.71)	19.6 (3.98)	16.3 (4.53)	23.7 (8.83)	0.275
C150	Pentadecanoico	0.23 (0.10)	0.24 (0.11)	0.21 (0.08)	0.271	0.23 (0.11)	0.24 (0.09)	0.814	0.24 (0.12)	0.19 (0.09)	0.24 (0.11)	0.23 (0.08)	0.513
C160	Palmítico	20.3 (2.17)	20.7 (2.41)	19.6 (1.38)	0.031	20.3 (2.11)	20.4 (2.29)	0.84	20.5 (2.30)	19.4 (1.05)	20.9 (2.63)	19.7 (1.59)	0.934
C170	Heptadecanoico	0.22 (0.04)	0.22 (0.04)	0.20 (0.04)	0.104	0.22 (0.04)	0.21 (0.04)	0.593	0.23 (0.04)	0.19 (0.03)	0.21 (0.03)	0.21 (0.04)	0.193
C180	Esteárico	4.80 (0.77)	4.81 (0.77)	4.77 (0.80)	0.885	4.79 (0.80)	4.80 (0.76)	0.968	4.70 (0.80)	5.08 (0.76)	4.98 (0.71)	4.58 (0.80)	0.095
C190	Ácido nonadecanoico	0.09 (0.03)	0.08 (0.03)	0.09 (0.04)	0.288	0.08 (0.03)	0.09 (0.03)	0.426	0.08 (0.04)	0.09 (0.02)	0.09 (0.03)	0.09 (0.04)	0.804
C200	Araquídico	0.11 (0.04)	0.10 (0.03)	0.12 (0.06)	0.365	0.11 (0.04)	0.11 (0.05)	0.528	0.10 (0.04)	0.11 (0.02)	0.10 (0.02)	0.12 (0.08)	0.615
C210	Heneicosanoico	0.20 (0.05)	0.19 (0.05)	0.22 (0.03)	0.018	0.20 (0.04)	0.20 (0.05)	0.72	0.19 (0.05)	0.22 (0.02)	0.19 (0.06)	0.22 (0.04)	0.882

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(%)		N=54	N=36	N=18		N=29	N=25		N=22	N=7	N=14	N=11	
C220	Behénico	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.071	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.152	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.862
C230	Tricosanoico	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.044	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.939	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.639
C240	Lignocérico	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.059	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.627	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.01 (0.01)	0.02 (0.02)	0.226
<i>Saturados</i>		44.0 (6.14)	42.4 (5.33)	47.3 (6.48)	0.009	42.7 (4.84)	45.6 (7.15)	0.086	42.0 (4.88)	44.9 (4.27)	43.1 (6.09)	48.9 (7.31)	0.395
C141n5	Miristoleico	0.18 (0.09)	0.18 (0.10)	0.17 (0.06)	0.776	0.17 (0.10)	0.19 (0.08)	0.471	0.18 (0.11)	0.14 (0.06)	0.18 (0.10)	0.19 (0.05)	0.305
C151n5	cis-10-Pentadecenoico	0.05 (0.02)	0.05 (0.02)	0.05 (0.02)	0.623	0.05 (0.02)	0.05 (0.02)	0.542	0.05 (0.02)	0.04 (0.02)	0.05 (0.02)	0.06 (0.02)	0.165
C161n9	Hexadecenoico	0.46 (0.10)	0.48 (0.11)	0.40 (0.07)	0.002	0.48 (0.11)	0.43 (0.09)	0.103	0.50 (0.11)	0.41 (0.07)	0.46 (0.10)	0.40 (0.07)	0.714
C161n7	cis-9-Palmitoleico	1.92 (0.63)	2.05 (0.68)	1.66 (0.42)	0.012	1.94 (0.65)	1.89 (0.61)	0.778	2.02 (0.69)	1.68 (0.48)	2.09 (0.68)	1.64 (0.41)	0.749
C171n7	cis-10-Heptadecenoico	0.15 (0.03)	0.15 (0.03)	0.13 (0.03)	0.004	0.15 (0.03)	0.14 (0.03)	0.07	0.16 (0.03)	0.13 (0.02)	0.14 (0.02)	0.13 (0.03)	0.288
C181n9	Oleico	34.7 (5.91)	36.8 (5.55)	30.6 (4.31)	<0.001	36.3 (4.48)	33.0 (6.91)	0.049	37.2 (4.51)	33.4 (3.08)	36.2 (7.03)	28.9 (4.15)	0.252
C181n7	cis-Vaccénico	1.70 (0.32)	1.82 (0.29)	1.46 (0.21)	<0.001	1.77 (0.25)	1.62 (0.37)	0.103	1.85 (0.21)	1.53 (0.21)	1.78 (0.40)	1.42 (0.22)	0.781
C201n9	cis-11-Eicosenoico	0.02 (0.02)	0.02 (0.02)	0.02 (0.01)	0.271	0.03 (0.02)	0.02 (0.01)	0.216	0.03 (0.03)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.948
C221n11	Cetoleico	0.03 (0.01)	0.03 (0.01)	0.03 (0.01)	0.939	0.03 (0.01)	0.03 (0.02)	0.722	0.03 (0.01)	0.03 (0.01)	0.03 (0.02)	0.03 (0.01)	0.968
C221n9	Erúcico	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.02)	0.15	0.02 (0.01)	0.02 (0.02)	0.339	0.02 (0.01)	0.02 (0.00)	0.02 (0.01)	0.03 (0.03)	0.249
<i>Monoinsaturados</i>		39.3 (6.36)	41.6 (5.84)	34.6 (4.57)	<0.001	40.9 (4.84)	37.4 (7.42)	0.05	42.0 (4.75)	37.4 (3.38)	41.0 (7.40)	32.8 (4.43)	0.273
C162n4	Palmitolinoleico	0.00 (0.01)	0.00 (0.00)	0.00 (0.01)	0.267	0.00 (0.00)	0.00 (0.01)	0.337	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.01)	0.653
C182n6	Linoléico	14.4 (3.71)	13.7 (3.67)	15.9 (3.40)	0.033	14.1 (3.61)	14.8 (3.85)	0.446	13.6 (3.90)	15.5 (2.12)	13.8 (3.43)	16.2 (4.08)	0.790

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(%)		N=54	N=36	N=18		N=29	N=25		N=22	N=7	N=14	N=11	
C183n6	γ-Linolénico	0.13 (0.05)	0.13 (0.05)	0.12 (0.06)	0.608	0.13 (0.05)	0.13 (0.05)	0.882	0.13 (0.05)	0.11 (0.03)	0.13 (0.04)	0.13 (0.07)	0.487
C183n3	α-Linolénico	0.62 (0.26)	0.63 (0.23)	0.59 (0.32)	0.655	0.69 (0.28)	0.54 (0.23)	0.039	0.67 (0.26)	0.73 (0.34)	0.57 (0.18)	0.51 (0.29)	0.458
C184n3	Estearidónico	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.029	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.01	0.03 (0.01)	0.03 (0.01)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.089
C203n6	Dihomo-γ-linolénico	0.29 (0.09)	0.28 (0.08)	0.30 (0.10)	0.603	0.29 (0.08)	0.29 (0.10)	0.838	0.29 (0.09)	0.29 (0.06)	0.28 (0.08)	0.31 (0.12)	0.658
C204n6	Araquidónico	0.33 (0.07)	0.33 (0.08)	0.32 (0.06)	0.639	0.34 (0.08)	0.32 (0.05)	0.26	0.34 (0.09)	0.33 (0.04)	0.32 (0.04)	0.32 (0.07)	0.869
C204n3	Eicosatetraenoico	0.07 (0.02)	0.08 (0.02)	0.07 (0.02)	0.74	0.08 (0.02)	0.07 (0.02)	0.022	0.08 (0.02)	0.08 (0.02)	0.07 (0.02)	0.07 (0.02)	0.486
C205n3	EPA	0.05 (0.04)	0.05 (0.04)	0.04 (0.04)	0.672	0.05 (0.03)	0.05 (0.05)	0.562	0.04 (0.03)	0.05 (0.03)	0.06 (0.05)	0.04 (0.04)	0.566
C225n3	DPA	0.05 (0.02)	0.05 (0.02)	0.05 (0.02)	0.793	0.05 (0.02)	0.05 (0.02)	0.812	0.05 (0.02)	0.05 (0.01)	0.05 (0.02)	0.05 (0.02)	0.408
C226n3	DHA	0.14 (0.07)	0.15 (0.07)	0.13 (0.08)	0.562	0.14 (0.06)	0.15 (0.09)	0.813	0.15 (0.06)	0.13 (0.06)	0.15 (0.09)	0.14 (0.10)	0.832
<i>Poliinsaturados</i>		16.1 (3.77)	15.4 (3.71)	17.6 (3.55)	0.045	15.8 (3.64)	16.5 (3.96)	0.557	15.4 (3.90)	17.2 (2.35)	15.4 (3.52)	17.8 (4.25)	0.825
<i>Omega 6</i>		15.2 (3.77)	14.4 (3.71)	16.6 (3.52)	0.038	14.8 (3.63)	15.6 (3.95)	0.465	14.4 (3.92)	16.2 (2.19)	14.5 (3.48)	16.9 (4.24)	0.775
<i>Omega 3</i>		0.96 (0.32)	0.98 (0.31)	0.92 (0.35)	0.502	1.03 (0.31)	0.88 (0.32)	0.084	1.02 (0.30)	1.06 (0.35)	0.92 (0.32)	0.82 (0.33)	0.450
<i>Ratio Omega 6 / Omega 3</i>		17.6 (7.86)	16.1 (6.90)	20.6 (8.95)	0.072	15.6 (5.89)	20.0 (9.22)	0.047	15.3 (6.26)	16.5 (4.85)	17.4 (7.87)	23.3 (10.1)	0.294
<i>Ratio AA / DHA</i>		2.74 (1.19)	2.66 (1.25)	2.90 (1.07)	0.468	2.70 (1.01)	2.79 (1.39)	0.788	2.59 (0.96)	3.03 (1.16)	2.77 (1.65)	2.81 (1.06)	0.584
<i>Ratio C17:0/C21:0</i>		1.15 (0.37)	1.25 (0.40)	0.96 (0.23)	0.001	1.18 (0.43)	1.11 (0.30)	0.513	1.27 (0.44)	0.89 (0.23)	1.21 (0.31)	1.00 (0.23)	0.042
C181n1t	trans-7-Octadecenoico	0.01 (0.02)	0.01 (0.02)	0.01 (0.01)	0.608	0.01 (0.03)	0.01 (0.01)	0.422	0.02 (0.03)	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.331
C181n9t	Elaidico	0.15 (0.14)	0.16 (0.17)	0.13 (0.06)	0.339	0.17 (0.19)	0.13 (0.06)	0.186	0.20 (0.21)	0.11 (0.06)	0.11 (0.06)	0.14 (0.07)	0.162

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(%)		N=54	N=36	N=18		N=29	N=25		N=22	N=7	N=14	N=11	
C182n6tt	Linoeláidico	0.04 (0.02)	0.04 (0.02)	0.04 (0.03)	0.56	0.04 (0.03)	0.05 (0.02)	0.578	0.04 (0.03)	0.03 (0.03)	0.05 (0.02)	0.04 (0.03)	0.535
<i>Trans</i>		0.19 (0.16)	0.21 (0.19)	0.16 (0.10)	0.165	0.22 (0.21)	0.16 (0.09)	0.185	0.26 (0.23)	0.12 (0.09)	0.14 (0.09)	0.18 (0.09)	0.044
c9t11CLA	Ruménico	0.09 (0.03)	0.09 (0.03)	0.09 (0.03)	0.78	0.09 (0.04)	0.09 (0.03)	0.465	0.09 (0.04)	0.07 (0.03)	0.09 (0.03)	0.10 (0.03)	0.175
t10c12CLA	10,12-CLA	0.02 (0.02)	0.02 (0.01)	0.02 (0.02)	0.675	0.02 (0.02)	0.02 (0.01)	0.537	0.02 (0.01)	0.03 (0.04)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.246
?	no identificado	0.25 (0.05)	0.26 (0.05)	0.23 (0.05)	0.012	0.26 (0.04)	0.24 (0.06)	0.101	0.27 (0.04)	0.25 (0.04)	0.26 (0.06)	0.22 (0.05)	0.413

Tabla 4.18 Concentración de ácidos grasos individuales (% relativo al total identificado) en leche al mes dos de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. Cuando fue necesario se aplicó análisis post-hoc de Tukey y si se obtuvieron diferencias inter-grupales, éstas se señalaron mediante letras como superíndices. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(%)		N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=21	N=8	N=15	N=11	
C80	Caprílico	2.05 (1.96)	2.18 (2.23)	1.82 (1.33)	0.464	1.93 (1.33)	2.19 (2.51)	0.628	1.83 (1.20)	2.18 (1.68)	2.66 (3.15)	1.56 (1.01)	0.209
C100	Cáprico	2.26 (0.73)	2.18 (0.72)	2.41 (0.74)	0.284	2.27 (0.70)	2.24 (0.77)	0.87	2.24 (0.74)	2.37 (0.61)	2.10 (0.70)	2.44 (0.86)	0.629
C120	Láurico	7.81 (3.14)	7.12 (2.93)	9.14 (3.18)	0.028	7.76 (3.06)	7.87 (3.29)	0.903	7.03 (2.82)	9.68 (3.01)	7.23 (3.18)	8.74 (3.39)	0.522
C140	Mirístico	6.53 (2.59)	5.94 (2.56)	7.64 (2.31)	0.017	6.44 (2.12)	6.62 (3.06)	0.8	5.80 (2.05)	8.11 (1.25)	6.13 (3.20)	7.30 (2.87)	0.434
<i>Cadena media</i>		18.7 (7.20)	17.4 (7.37)	21.0 (6.40)	0.068	18.4 (6.09)	18.9 (8.38)	0.794	16.9 (5.83)	22.3 (5.19)	18.1 (9.29)	20.0 (7.24)	0.397

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(%)		N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=21	N=8	N=15	N=11	
C150	Pentadecanoico	0.22 (0.09)	0.23 (0.09)	0.20 (0.09)	0.363	0.22 (0.10)	0.22 (0.08)	0.906	0.23 (0.10)	0.19 (0.08)	0.22 (0.08)	0.22 (0.09)	0.506
C160	Palmitico	20.1 (2.53)	20.1 (2.60)	20.1 (2.48)	0.963	20.1 (2.41)	20.0 (2.72)	0.88	20.0 (2.65)	20.4 (1.72)	20.1 (2.61)	19.9 (2.99)	0.730
C170	Heptadecanoico	0.21 (0.04)	0.22 (0.04)	0.21 (0.04)	0.447	0.22 (0.04)	0.21 (0.04)	0.497	0.22 (0.05)	0.21 (0.03)	0.21 (0.03)	0.21 (0.05)	0.903
C180	Esteárico	4.73 (0.90)	4.70 (0.91)	4.77 (0.89)	0.793	4.73 (0.95)	4.72 (0.85)	0.971	4.71 (1.05)	4.80 (0.68)	4.70 (0.72)	4.75 (1.04)	0.934
C190	Ácido nonadecanoico	0.09 (0.04)	0.09 (0.04)	0.09 (0.03)	0.829	0.09 (0.03)	0.08 (0.04)	0.303	0.10 (0.03)	0.09 (0.04)	0.08 (0.05)	0.09 (0.03)	0.191
C200	Araquídico	0.10 (0.03)	0.11 (0.03)	0.10 (0.02)	0.433	0.10 (0.02)	0.11 (0.03)	0.48	0.10 (0.02)	0.10 (0.01)	0.11 (0.04)	0.10 (0.03)	0.197
C210	Heneicosanoico	0.18 (0.04)	0.17 (0.03)	0.20 (0.04)	0.027	0.18 (0.04)	0.18 (0.04)	0.97	0.17 (0.03) ^a	0.22 (0.03) ^b	0.18 (0.04) ^a	0.19 (0.05) ^a	0.029
C220	Behénico	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.242	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.813	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.102
C230	Tricosanoico	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.159	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.92	0.02 (0.01) ^a	0.03 (0.01) ^b	0.02 (0.01) ^a	0.02 (0.00) ^a	0.001
C240	Lignocérico	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.262	0.02 (0.00)	0.02 (0.01)	0.704	0.02 (0.01)	0.02 (0.00)	0.02 (0.02)	0.01 (0.01)	0.517
<i>Saturados</i>		44.3 (7.34)	43.1 (7.53)	46.7 (6.47)	0.065	44.1 (6.05)	44.5 (8.67)	0.846	42.5 (5.89)	48.4 (4.34)	43.8 (9.55)	45.6 (7.64)	0.331
C141n5	Miristoleico	0.18 (0.09)	0.18 (0.09)	0.18 (0.10)	0.916	0.19 (0.09)	0.18 (0.10)	0.789	0.19 (0.09)	0.18 (0.11)	0.18 (0.10)	0.18 (0.09)	0.824
C151n5	cis-10-Pentadecenoico	0.05 (0.03)	0.05 (0.02)	0.05 (0.03)	0.329	0.05 (0.03)	0.05 (0.02)	0.855	0.06 (0.03)	0.04 (0.04)	0.05 (0.02)	0.05 (0.02)	0.575
C161n9	Hexadecenoico	0.46 (0.14)	0.48 (0.16)	0.42 (0.08)	0.109	0.45 (0.10)	0.47 (0.17)	0.544	0.47 (0.11)	0.39 (0.06)	0.49 (0.22)	0.45 (0.09)	0.659
C161n7	cis-9-Palmitoleico	1.81 (0.52)	1.77 (0.52)	1.88 (0.53)	0.438	1.78 (0.52)	1.84 (0.53)	0.662	1.75 (0.56)	1.86 (0.45)	1.79 (0.48)	1.90 (0.61)	0.995
C171n7	cis-10-Heptadecenoico	0.14 (0.03)	0.14 (0.03)	0.14 (0.03)	0.795	0.14 (0.03)	0.14 (0.03)	0.944	0.15 (0.03)	0.13 (0.03)	0.14 (0.03)	0.15 (0.04)	0.235
C181n9	Oleico	34.9 (5.82)	36.1 (5.49)	32.5 (5.87)	0.037	34.7 (4.44)	35.1 (7.15)	0.806	36.3 (3.94)	30.3 (2.07)	35.7 (7.28)	34.2 (7.22)	0.170

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(%)		N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=21	N=8	N=15	N=11	
C181n7	cis-Vaccénico	1.68 (0.28)	1.72 (0.24)	1.61 (0.34)	0.194	1.66 (0.23)	1.71 (0.33)	0.579	1.72 (0.19)	1.52 (0.30)	1.74 (0.30)	1.67 (0.38)	0.465
C201n9	cis-11-Eicosenoico	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.899	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.937	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.968
C221n11	Cetoleico	0.03 (0.02)	0.03 (0.02)	0.03 (0.01)	0.903	0.03 (0.01)	0.03 (0.02)	0.369	0.03 (0.01)	0.03 (0.02)	0.03 (0.02)	0.03 (0.01)	0.616
C221n9	Erúcico	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.871	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.888	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.333
<i>Monoinsaturados</i>		39.2 (6.00)	40.5 (5.66)	36.9 (6.07)	0.039	39.0 (4.66)	39.5 (7.30)	0.755	40.7 (4.14)	34.5 (2.41)	40.2 (7.44)	38.6 (7.37)	0.165
C162n4	Palmitolinoleico	0.00 (0.01)	0.00 (0.01)	0.00 (0.00)	0.668	0.00 (0.01)	0.00 (0.01)	0.739	0.01 (0.01)	0.00 (0.00)	0.00 (0.01)	0.00 (0.01)	0.347
C182n6	Linoléico	14.2 (3.84)	14.3 (3.90)	14.2 (3.84)	0.96	14.7 (3.74)	13.8 (3.97)	0.394	14.6 (3.95)	14.9 (3.37)	13.8 (3.92)	13.7 (4.24)	0.843
C183n6	γ-Linolénico	0.11 (0.04)	0.12 (0.04)	0.11 (0.05)	0.723	0.12 (0.04)	0.11 (0.05)	0.492	0.12 (0.04)	0.11 (0.03)	0.11 (0.04)	0.11 (0.06)	0.698
C183n3	α-Linolénico	0.59 (0.35)	0.63 (0.40)	0.53 (0.23)	0.227	0.61 (0.29)	0.58 (0.41)	0.785	0.60 (0.29)	0.62 (0.32)	0.67 (0.52)	0.46 (0.09)	0.249
C184n3	Estearidónico	0.03 (0.01)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.331	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	0.613	0.03 (0.01)	0.02 (0.00)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.907
C203n6	Dihomo-γ-linolénico	0.25 (0.06)	0.24 (0.06)	0.27 (0.06)	0.041	0.25 (0.06)	0.25 (0.06)	0.639	0.24 (0.06)	0.29 (0.06)	0.23 (0.06)	0.26 (0.06)	0.420
C204n6	Araquidónico	0.30 (0.06)	0.30 (0.05)	0.31 (0.06)	0.312	0.31 (0.06)	0.30 (0.05)	0.531	0.30 (0.06)	0.33 (0.06)	0.29 (0.04)	0.30 (0.07)	0.509
C204n3	Eicosatetraenoico	0.07 (0.03)	0.07 (0.03)	0.07 (0.04)	0.801	0.07 (0.02)	0.07 (0.04)	0.698	0.07 (0.02)	0.08 (0.03)	0.07 (0.03)	0.07 (0.04)	0.907
C205n3	EPA	0.05 (0.06)	0.06 (0.08)	0.04 (0.03)	0.161	0.06 (0.08)	0.05 (0.03)	0.833	0.06 (0.10)	0.04 (0.03)	0.06 (0.04)	0.04 (0.03)	0.814
C225n3	DPA	0.05 (0.02)	0.05 (0.02)	0.05 (0.02)	0.98	0.05 (0.02)	0.05 (0.03)	0.823	0.05 (0.02)	0.05 (0.01)	0.05 (0.03)	0.05 (0.02)	0.914
C226n3	DHA	0.14 (0.07)	0.15 (0.07)	0.13 (0.05)	0.183	0.14 (0.07)	0.14 (0.06)	0.985	0.15 (0.08)	0.11 (0.05)	0.14 (0.07)	0.13 (0.05)	0.515
<i>Poliinsaturados</i>		15.9 (3.98)	15.9 (4.00)	15.8 (4.06)	0.895	16.3 (3.80)	15.4 (4.19)	0.382	16.2 (3.94)	16.6 (3.65)	15.5 (4.18)	15.2 (4.41)	0.770

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(%)		N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=21	N=8	N=15	N=11	
	<i>Omega 6</i>	14.9 (3.87)	14.9 (3.90)	14.9 (3.90)	0.996	15.4 (3.75)	14.4 (4.01)	0.384	15.2 (3.94)	15.6 (3.41)	14.5 (3.94)	14.4 (4.30)	0.830
	<i>Omega 3</i>	0.94 (0.46)	0.99 (0.53)	0.84 (0.29)	0.189	0.95 (0.42)	0.92 (0.51)	0.807	0.96 (0.44)	0.92 (0.39)	1.02 (0.65)	0.78 (0.18)	0.457
	<i>Ratio Omega 6 / Omega 3</i>	18.0 (6.52)	17.6 (6.99)	18.9 (5.59)	0.454	18.2 (6.80)	17.8 (6.32)	0.825	17.8 (6.79)	19.2 (7.18)	17.2 (7.49)	18.6 (4.47)	0.996
	<i>Ratio AA / DHA</i>	2.56 (1.07)	2.41 (1.05)	2.84 (1.07)	0.166	2.66 (1.16)	2.45 (0.96)	0.466	2.41 (1.10)	3.30 (1.14)	2.41 (1.01)	2.50 (0.93)	0.196
	<i>Ratio C17:0/C21:0</i>	1.21 (0.33)	1.28 (0.30)	1.09 (0.37)	0.064	1.23 (0.32)	1.20 (0.35)	0.712	1.32 (0.30)	0.98 (0.24)	1.21 (0.29)	1.17 (0.43)	0.080
C181n11t	trans-7-Octadecenoico	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.254	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.642	0.01 (0.01)	0.02 (0.01)	0.01 (0.01)	0.01 (0.00)	0.380
C181n9t	Eláidico	0.14 (0.08)	0.13 (0.05)	0.16 (0.11)	0.355	0.14 (0.09)	0.14 (0.06)	0.75	0.13 (0.06)	0.17 (0.14)	0.13 (0.04)	0.15 (0.09)	0.691
C182n6tt	Linoelaídico	0.04 (0.02)	0.04 (0.02)	0.05 (0.02)	0.722	0.05 (0.02)	0.04 (0.02)	0.51	0.05 (0.02)	0.04 (0.02)	0.04 (0.02)	0.05 (0.02)	0.142
	<i>Trans</i>	0.18 (0.10)	0.17 (0.08)	0.19 (0.13)	0.534	0.19 (0.11)	0.18 (0.09)	0.635	0.18 (0.09)	0.20 (0.16)	0.16 (0.06)	0.19 (0.11)	0.904
c9t11CLA	Ruménico	0.10 (0.04)	0.10 (0.04)	0.09 (0.05)	0.761	0.10 (0.04)	0.09 (0.04)	0.861	0.10 (0.04)	0.09 (0.04)	0.09 (0.03)	0.10 (0.05)	0.396
t10c12CLA	10,12-CLA	0.03 (0.03)	0.02 (0.01)	0.03 (0.04)	0.434	0.02 (0.01)	0.03 (0.04)	0.447	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)	0.04 (0.06)	0.259
?	no identificado	0.25 (0.12)	0.24 (0.04)	0.27 (0.19)	0.411	0.23 (0.03)	0.27 (0.17)	0.303	0.23 (0.03)	0.23 (0.04)	0.24 (0.05)	0.30 (0.25)	0.392

Tabla 4.19 Concentración de ácidos grasos individuales (% relativo al total identificado) en leche al mes tres de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. Cuando fue necesario se aplicó análisis post-hoc de Tukey y si se obtuvieron diferencias inter-grupales, éstas se señalaron mediante letras como superíndices. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Así, observamos un mayor número de diferencias significativas hacia el segundo mes de lactancia que coincidió con la observación de los cambios más pronunciados en la fracción de AGNE descrita en el capítulo anterior (4.3.1.1).

En primer lugar observamos que el sexo del lactante no influyó sobre el perfil de AG en el primer o tercer mes de lactancia, mientras que en el segundo mes se observaron valores mayores de ácido oleico (C18:1n9, $p=0.049$) y por tanto para el total de AGMI ($p=0.050$) así como para un grupo de Omega 3 (C18:3n3, $p=0.039$; C18:4n3, $p=0.010$; C20:4n3, $p=0.022$) en leches de madres que parieron una niña. Esto se tradujo en un ratio Omega 6/Omega 3 mayor significativamente en la leche de madres que tuvieron un niño ($p=0.047$).

De forma similar el IMC materno afectó a los AG láurico (C12:0, $p=0.008$), mirístico (C14:0, $p=0.006$), AGCM ($p=0.012$) y oleico (C18:1n9, $p=0.001$) en el primer mes de lactancia y sobre el láurico (C12:0, $p=0.028$), mirístico (C14:0, $p=0.017$), heneicosanoico (C21:0, $p=0.027$), oleico (C18:1n9, $p=0.037$), AGMI ($p=0.039$) y dihomo-gamma-linolénico (C20:3n6, $p=0.041$) en el tercer mes. En el segundo mes de lactancia la lista se extiende y se puede identificar un patrón claro diferencial asociado al IMC materno, concretamente las mujeres con $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$ presentaron una proporción mayor de AGCM ($p=0.004$) y AGPI ($p=0.045$) especialmente los Omega 6 ($p=0.038$) a la vez que la proporción de AGMI ($p=0.000$) fue menor significativamente en el segundo mes de lactancia (Figura 4.4).

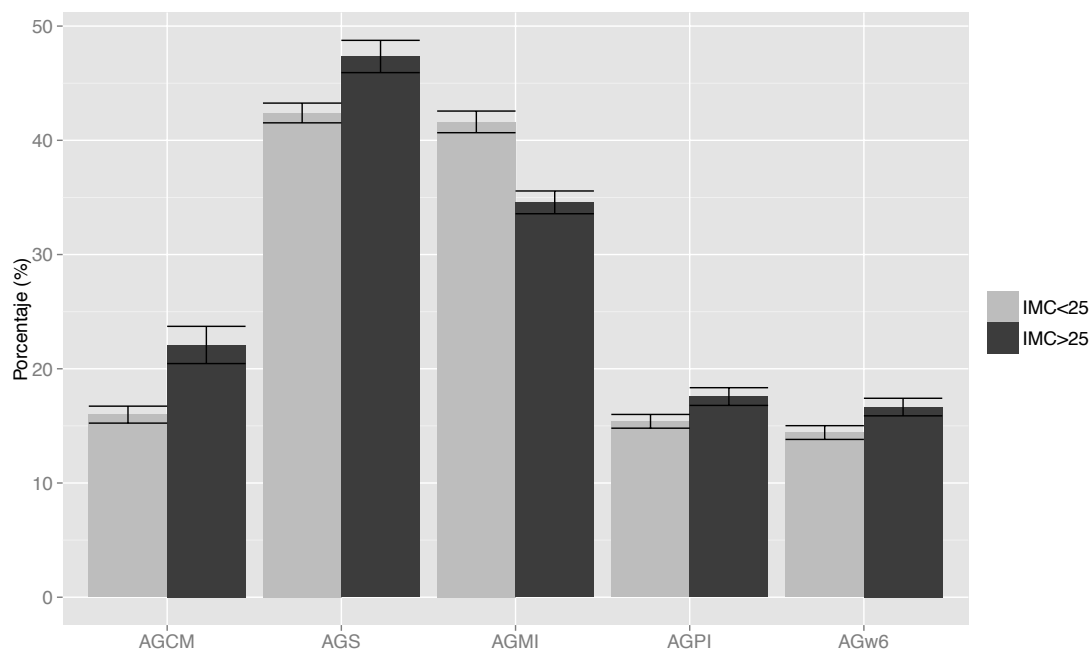


Figura 4.4 Diferencias significativas del perfil de ácidos grasos en leche materna al segundo mes de lactancia en función del IMC materno. Los datos son porcentajes promedios de cada grupo referidos al total de AG identificados más/menos el error tipo de la media. AGCM, ácidos grasos de cadena media; AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; AGw6, ácidos grasos omega 6. Las diferencias entre grupos fueron analizadas por el test de la *t*-Student. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Además, el ratio C17:0/C21:0 fue inferior en las madres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ($p=0.001$) en el segundo mes de lactancia, lo cual podría indicar una ingesta menor de centeno integral en este grupo, pudiendo significar la menor frecuencia de consumo de pan moreno por parte de las mujeres con sobrepeso u obesidad, ya que el pan moreno se hace mitad con harina de trigo y mitad de centeno. Sin embargo, no disponemos de datos que permitan confirmar estas diferencias y la ingesta de fibra entre grupos no es distinta, por lo que dicha observación solo se cita como precedente para el planteamiento futuro de nuevas hipótesis. De hecho, se han descrito ratios C17:0/C21:0 más bajos en poblaciones en situación de sobrepeso u obesidad (353) y también se ha relacionado con factores de comorbilidad asociados a la obesidad (355, 356) por lo que observar ratios inferiores en mujeres lactantes con sobrepeso u obesidad coincide con estas referencias.

Cuando ambos factores se estudiaron conjuntamente observamos un efecto interacción entre el IMC materno y el sexo del lactante sobre el eicosapentaenoico (C20:5n3, $p=0.023$) en el primer

mes, los AG *trans* (p=0.044) en el segundo mes y sobre los AG heneicosanoico (C21:0, p=0.029) y tricosanoico (C23:0, p=0.001) en el tercer mes.

PCA del perfil de AG

El análisis de componentes principales contribuyó en la evaluación de los perfiles de AG en leche materna que explicaron la mayor parte de la variabilidad en la población estudiada.

La metodología utilizada se ha descrito previamente en el capítulo 3.5.6.2. Se obtuvieron seis componentes principales que explicaron una proporción acumulada de la varianza del 81.2% (Tabla 4.20).

Ácidos grasos		PAG1	PAG2	PAG3	PAG4	PAG5	PAG6
Cáprico	C100	0.041	-0.207	-0.342	0.207	0.213	-0.014
Láurico	C120	0.065	-0.235	-0.366	0.247	0.102	-0.088
Mirístico	C140	-0.014	-0.180	-0.392	0.235	0.063	-0.107
Pentadecanoico	C150	-0.314	0.095	-0.148	-0.089	-0.009	0.080
Palmitico	C160	-0.300	0.022	-0.012	-0.058	-0.149	-0.144
Heptadecanoico	C170	-0.284	0.138	-0.042	-0.143	0.179	0.284
Behénico	C220	0.204	0.231	-0.226	-0.226	-0.249	0.022
Tricosanoico	C230	0.211	0.191	-0.293	-0.187	-0.218	0.082
Lignocérico	C240	0.209	0.225	-0.249	-0.229	-0.175	0.084
Miristoleico	C141n5	-0.304	0.091	-0.212	0.022	-0.090	-0.098
cis-10-Pentadecenoico	C151n5	-0.301	0.121	-0.160	-0.022	0.018	0.114
Hexadecenoico	C161n9	-0.051	0.308	0.132	0.142	0.342	-0.133
cis-9-Palmitoleico	C161n7	-0.102	0.271	-0.019	-0.077	0.059	-0.724
cis-10-Heptadecenoico	C171n7	-0.243	0.215	0.048	-0.045	0.188	-0.026
Oleico	C181n9	0.123	0.206	0.341	-0.139	0.175	0.149
cis-11-Eicosenoico	C201n9	0.058	0.300	0.007	0.343	-0.022	0.060
Cetoleico	C221n11	0.042	0.256	-0.004	0.339	0.118	0.096
Erúico	C221n9	0.228	0.239	-0.234	-0.075	0.065	0.182
γ -Linolénico	C183n6	0.031	0.103	0.172	0.255	-0.571	-0.242
Dihomo- γ -linolénico	C203n6	-0.013	0.266	-0.020	0.436	-0.037	0.211

Ácidos grasos		PAG1	PAG2	PAG3	PAG4	PAG5	PAG6
Araquidónico	C204n6	0.076	0.123	0.076	0.342	-0.143	0.104
Eicosatetraenoico	C204n3	0.211	0.246	-0.140	-0.065	0.115	-0.141
EPA	C205n3	0.176	0.146	-0.126	-0.058	0.359	-0.227
Linoelaídico	C182n6tt	-0.300	0.122	-0.138	0.025	-0.202	-0.040
Ruménico	c9t11CLA	-0.310	0.118	-0.145	-0.057	-0.029	0.198
Varianza acumulada explicada (%)		28.86	46.95	61.43	72.12	77.69	81.21
IMC materno	IMC<25		0.40	0.35	-0.26		0.13
	IMC>25		-0.72	-0.63	0.48		-0.23
	p-valor		0.053	0.060	0.100		0.161
Sexo lactante	Niña				0.18		
	Niño				-0.20		
	p-valor				0.377		
Interacción IMC x sexo	Niña IMC<25	-0.57			0.01		0.24
	Niña IMC>25	0.61			0.60		-0.43
	Niño IMC<25	0.60			-0.64		-0.02
	Niño IMC>25	-0.22			0.39		-0.09
	p-valor	0.187			0.624		0.254

Tabla 4.20 Matriz de coeficientes de correlación y porcentajes de la varianza explicada por cada componente extraído del análisis de componentes principales (PCA) del perfil de ácidos grasos (AG) en leche materna. Se incluyen las puntuaciones promedio de adherencia a cada uno de los componentes y las diferencias asociadas al IMC materno y sexo del lactante.

El primer componente (PAG1) se caracterizó por una proporción baja de AGS y AGMI de cadena media, así como del ácido graso *trans* C18:2n6t y del 9,11-CLA, simultáneamente a una alta proporción de los AGS de cadena larga, el C22:1n9 y el Omega 3 C20:4n3. El segundo componente (PAG2) se asoció a un perfil rico en AGMI, dihomo- γ -linolénico y eicosatetraenoico pero pobre en los AGCM cáprico y láurico. El tercer componente (PAG3) presentó un perfil rico en ácido oleico y pobre en saturados; el cuarto componente (PAG4) fue rico en AGCM, AGMI de cadena larga y Omega 6; el quinto (PAG5) presentó un perfil bajo en γ -linolénico pero alto en hexadecenoico y EPA y el sexto (PAG6) se caracterizó por niveles bajos de cis-9-palmitoleico.

Del análisis estadístico de la adherencia de cada individuo a los componentes descritos y las diferencias entre grupos en base a los factores de interés observamos una tendencia diferencial en la adherencia al perfil de AG rico en AGMI y pobre en AGCM (PAG2) entre grupos por IMC materno ($p=0.053$) con una mejor adherencia por parte de las mujeres con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ (0.40) frente a las que tenían sobrepeso u obesidad (-0.72). Este mismo patrón se repitió para el perfil rico en oleico (PAG3, $p=0.060$). Además, las mujeres con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ presentaron una tendencia a adherirse mejor al perfil pobre en palmitoleico (PAG6) y peor al perfil rico en Omega 6, AGCM y AGMI de cadena larga (PAG4).

En definitiva, las mujeres con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ presentaron en leche mayores niveles de AGMI, especialmente oleico y menores de AGCM, así como una tendencia a menores proporciones de Omega 6 y palmitoleico en comparación con las mujeres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ durante los primeros tres meses de lactancia materna de acuerdo al análisis de componentes principales.

Estudio de correlaciones del perfil de AG en leche materna frente a variables antropométricas maternas y del crecimiento de la descendencia

Tras el análisis del perfil de AG según los factores de interés, llevamos a cabo un estudio de correlaciones entre los perfiles de AG descritos en leche materna de la población estudiada frente a variables antropométricas y del crecimiento infantil. La matriz de correlaciones se presenta en forma de correlograma para el promedio de las tres determinaciones de los AG en leche materna (Figura 4.5).

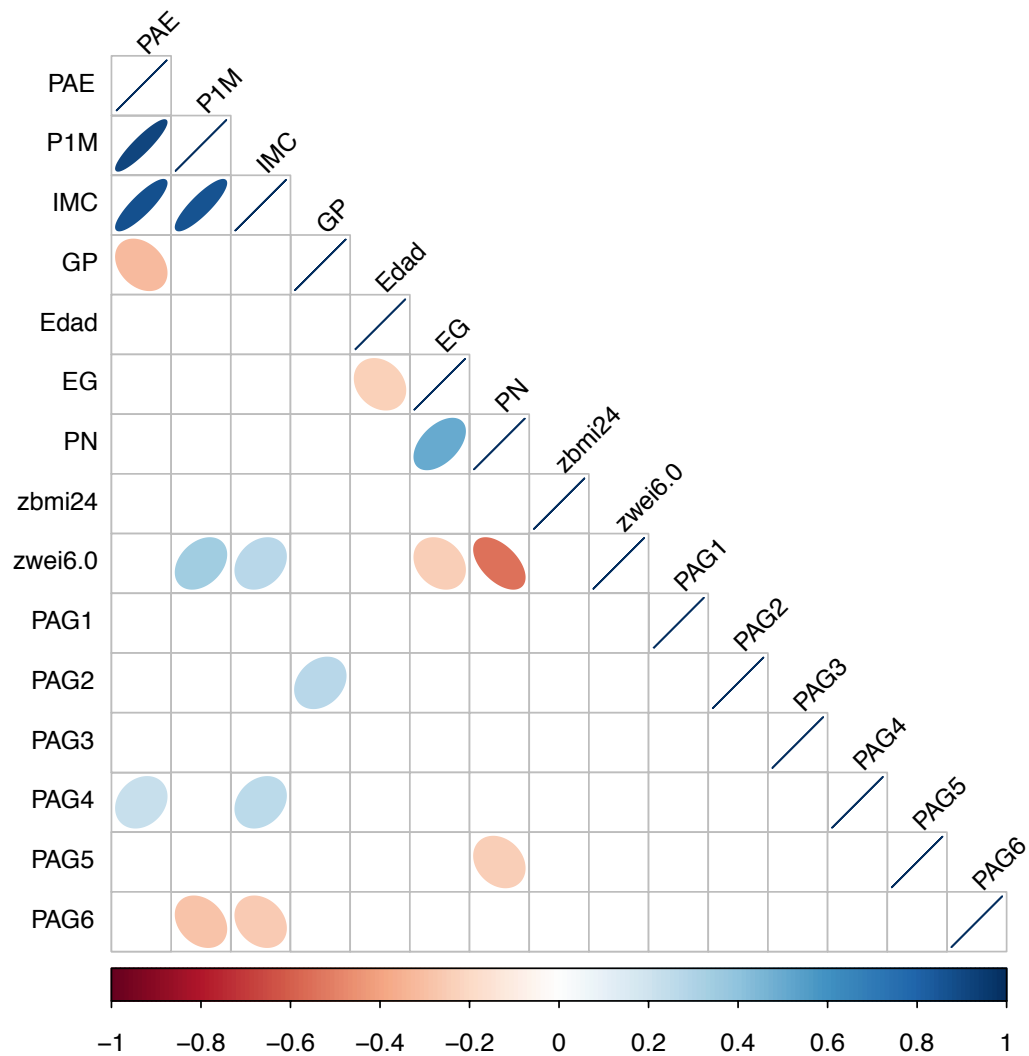


Figura 4.5 Correlograma de los perfiles de ácidos grasos en leche materna extraídos mediante el análisis de componentes principales (PAG1-PAG6) y variables antropométricas maternas y de la descendencia. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$, quedando en blanco aquellas correlaciones no estadísticamente significativas. Las correlaciones positivas se muestran en azul y las negativas en rojo. La intensidad de los colores responde a la intensidad de la correlación de Pearson. PAE, peso antes del embarazo; P1M, peso materno al mes de lactancia; IMC, índice de masa corporal materno promedio; GP, ganancia de peso durante el embarazo; EG, edad gestacional; PN, peso al nacer de la descendencia; zbmi24, z-scores para el IMC para la edad a los 24 meses; zwei6.0, velocidad de ganancia de peso entre el nacimiento y los 6 meses.

Así, observamos correlaciones positivas entre la ganancia de peso durante el embarazo y la adherencia al perfil rico en AGMI y pobre en AGCM ($R=0.27$, $p=0.032$) (PAG2) por un lado, y el peso antes del embarazo ($R=0.23$, $p=0.035$) y el IMC materno ($R=0.26$, $p=0.018$) con la

adherencia al perfil rico en AGMI de cadena larga (C20:1n9 y C22:1n11) y Omega 6 (C18:3n6, C20:3n6 y C20:4n6) (PAG4).

Puesto que a mayor peso antes del embarazo menor fue la ganancia del mismo durante el embarazo ($R=-0.32$, $p=0.011$) y este efecto también se observó para el IMC materno antes del embarazo (datos no mostrados), así deducimos que el sobrepeso u obesidad durante el embarazo y la lactancia determinó un perfil en leche materna pobre en AGMI de cadena media incluyendo el ácido oleico, pero rico en AGCM, especialmente el cáprico y el láurico, así como AGMI de cadena larga (más de 20 carbonos) y los Omega 6 anteriormente enumerados.

Además, el peso materno al mes de lactancia ($R=-0.28$, $p=0.010$) y el IMC ($R=-0.25$, $p=0.024$) se correlacionaron negativamente frente al perfil pobre en ácido cis-9-palmitoleico (C16:1n7) y rico en ácido heptadecanoico (C17:0) (PAG6), lo cual se traduce en que las mujeres con sobrepeso u obesidad presentaron mayores proporciones de palmitoleico y menores de C17:0 en leche materna durante los primeros tres meses de lactancia, aunque esta aproximación no queda suficientemente respaldada cuando se observan los valores individuales (Tablas 4.17-19).

Por último, observamos una correlación negativa entre el peso al nacer de la descendencia y el perfil pobre en gamma-linolénico (C18:3n6) y rico en hexadecenoico (C16:1n9) y EPA ($R=-0.24$, $p=0.046$) (PAG5). Es decir, cuanto más pesó un recién nacido, mayores niveles de gamma-linolénico y menores de hexadecenoico y EPA se determinaron en la leche materna que mamaron.

Aunque hay pocos estudios hasta la fecha que hayan abordado el efecto del peso corporal materno sobre la composición en AG en la leche, en 2012, se describió en población finlandesa que las mujeres con sobrepeso presentan una proporción mayor de AGS y menor de Omega 3, así como un ratio Omega 6/Omega 3 mayor en comparación con las mujeres con peso normal (336). Posteriormente, se ha descrito una mayor proporción de AGS y menor de AGMI, especialmente del ácido oleico, en leche humana de mujeres que vivían en Grecia y cuya ganancia de peso durante el embarazo había sido más pronunciada (343), resultados que coinciden con los de la población estudiada.

Así mismo, más recientemente se han identificado porcentajes inferiores de AGMI en mujeres italianas con $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$ (41%) frente a mujeres con normopeso (47%) durante los primeros seis meses de lactancia (341).

Estudio longitudinal de la influencia de variables de confusión

Las variables enumeradas a continuación mostraron efectos sobre un número elevado de AGs: ganancia de peso durante el embarazo, etnia, ser o no primípara y el tipo de parto. Este efecto podría ser independiente para cada variable y cada AG individual o más probablemente, resultar de la coincidencia de las condiciones para cada individuo analizado, debido a una interrelación entre algunas variables de confusión como por ejemplo el peso corporal materno y el tipo de parto y de lactancia seguida, tal y como se ha indicado en el capítulo 4.1.

Aunque descifrar mediante este análisis el significado de los efectos encontrados es difícil y no detallamos la dirección de los mismos, sí identificamos algunas interrelaciones que comentamos a continuación (Tabla 4.16):

- Se observó un efecto del tipo de parto sobre los AGS de cadena larga, entre los cuales se encuentran los homólogos de los alkylresorcinoles, también sobre el ratio C17:0/C21:0 y los AGPI, Omega 6 y el ratio Omega 6/Omega 3.
- Se observó un efecto del número de partos previos sobre un conjunto de AGMI y AGPI, así como los ratios Omega 6/Omega 3, AA/DHA y C17:0/C21:0.
- Se observaron efectos de la etnia sobre un elevado número de AG como el capríco, mirístico, los de cadena impar C15 y C17, oleico, DHA, linoelaídico, ruménico, AGS y AGMI totales. Sin embargo, cabe recordar que solo contamos con 6 mujeres de etnia distinta de la caucásica.
- El ácido oleico respondió a variaciones asociadas al tipo de lactancia, la etnia y ser o no primípara.
- Los niveles de DHA en leche materna se vieron afectados por la etnia y la ganancia de peso durante el embarazo.
- La ingesta de suplementos tuvo un efecto sobre AGMI de cadena larga (cetoleico y erúxico).
- La estación del parto se asoció con distintos niveles para los ácidos caprílico, heneicosanoico (C21:0) y cetoleico, y el ratio C17:0/C21:0.
- Los AG Omega 3 se vieron influidos por el tamaño para la edad gestacional y la ganancia de peso durante el embarazo mientras que los Omega 6 fueron distintos en base al tipo de parto, ser o no primípara y la edad materna.

Aunque existen distintos estudios que presentan los efectos de algunos de estos factores sobre el perfil de AG (341), en la actualidad es necesario profundizar y estandarizar la metodología y diseño de los estudios, de manera que permitan establecer patrones claros en base a los múltiples factores que influyen simultáneamente sobre la composición de la leche materna.

4.3.2 Evolución del contenido en proteínas totales, proteínas bioactivas y aminoácidos libres

4.3.2.1 Concentración de proteínas totales

La media poblacional para la concentración de proteínas totales en cada una de las determinaciones fue de 0.58 ± 0.23 , 0.47 ± 0.11 y 0.45 ± 0.18 g/100mL, consecutivamente para los meses 1, 2 y 3 tras el parto. Los resultados obtenidos fueron inferiores a los presentados por otros autores en parte debido a la metodología utilizada (proteína vs nitrógeno total que incluye el nitrógeno no proteico), aunque la disminución con el avance de la lactancia fue significativa (Tabla 4.21, $p=0.000$) tal y como ha sido previamente descrito (338, 341, 342, 345, 357).

	Total	Mes 1	Mes 2	Mes 3	p-valor		
	N=163	N=53	N=55	N=55	Tiempo	IMC	Sexo
Proteínas totales (g/100mL)	0.50 (0.19)	0.58 (0.23)	0.47 (0.11)	0.45 (0.18)	0.000	0.446	0.119
Leptina (ng/mL)	0.35 (0.33)	0.38 (0.35)	0.34 (0.31)	0.34 (0.33)	0.844	0.000	0.322
Adiponectina (ng/mL)	21.5 (7.49)	23.4 (7.57)	20.8 (6.61)	20.3 (8.02)	0.066	0.081	0.002

Tabla 4.21 Concentración de proteínas totales, leptina y adiponectina en leche materna durante los primeros tres meses de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar. El análisis estadístico se ha realizado mediante ANOVA de medidas repetidas. Se incluye el análisis por modelo lineal mixto para la evaluación longitudinal del efecto de los factores índice de masa corporal (IMC) materno y sexo del lactante. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

El rango de concentraciones de proteínas en leche humana descrito en muestras de una red internacional de bancos de leche es de entre 0.7 y 2.1g/100mL (337). La concentración proteica promedio en mujeres lactantes españolas se sitúa ligeramente por encima de 1g/100mL (358-360), por lo que los resultados obtenidos en este estudio indican un contenido inferior de este componente en la población estudiada.

El efecto de los factores de interés sobre la concentración proteica de la leche materna no fue significativo a lo largo del periodo ensayado (Tablas 4.22-24), si bien en el tercer mes de lactancia se observó una interacción entre ambos factores ($p=0.041$), mostrando que las mujeres con $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$ que tuvieron una niña presentaron concentraciones de proteínas superiores a los restantes grupos (Tabla 4.24).

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
	N=53	N=35	N=18		N=29	N=24		N=21	N=8	N=14	N=10	
Proteínas (g/100mL)	0.58 (0.23)	0.57 (0.21)	0.60 (0.26)	0.624	0.62 (0.27)	0.53 (0.16)	0.160	0.60 (0.26)	0.66 (0.31)	0.52 (0.10)	0.56 (0.22)	0.944
Lactoferrina (µg/mL)	1995 (787)	1925 (590)	2135 (1090)	0.480	2103 (718)	1867 (860)	0.314	2027 (732)	2310 (688)	1776 (235)	1999 (1350)	0.904
Inmunoglobulina A (µg/mL)	489 (227)	479 (181)	510 (306)	0.710	580 (222)	380 (184)	0.001	553 (158)	660 (359)	361 (154)	404 (224)	0.614
Lisozima (µg/mL)	233 (317)	205 (285)	286 (375)	0.429	305 (408)	149 (118)	0.063	248 (361)	448 (507)	144 (90.0)	157 (155)	0.309
Leptina (ng/mL)	0.38 (0.35)	0.23 (0.15)	0.65 (0.46)	0.001	0.36 (0.34)	0.40 (0.37)	0.694	0.25 (0.16)	0.64 (0.53)	0.21 (0.14)	0.66 (0.43)	0.701
Adiponectina (ng/mL)	23.4 (7.57)	23.6 (7.97)	23.0 (6.94)	0.801	25.6 (7.42)	20.8 (7.05)	0.020	25.4 (8.38)	26.1 (4.38)	20.9 (6.74)	20.6 (7.82)	0.811

Tabla 4.22 Concentración de proteínas totales, lactoferrina, inmunoglobulina A (IgA), lisozima, leptina y adiponectina en leche materna al mes tras el parto. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el índice de masa corporal (IMC) materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. Cuando fue necesario se aplicó análisis post-hoc de Tukey y si se obtuvieron diferencias inter-grupales, éstas se señalaron mediante letras como superíndices. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
	N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=22	N=7	N=14	N=12	
Proteínas (g/100mL)	0.47 (0.11)	0.48 (0.12)	0.44 (0.07)	0.171	0.47 (0.09)	0.46 (0.12)	0.540	0.47 (0.10)	0.47 (0.06)	0.48 (0.15)	0.43 (0.07)	0.403
Leptina (ng/mL)	0.34 (0.31)	0.24 (0.24)	0.53	0.004	0.31 (0.26)	0.37 (0.37)	0.486	0.27 (0.26)	0.45 (0.24)	0.20 (0.22)	0.57 (0.41)	0.279

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
	N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=22	N=7	N=14	N=12	
			(0.35)									
Adiponectina (ng/mL)	20.8 (6.61)	20.0 (7.03)	22.4 (5.58)	0.183	22.3 (7.09)	19.2 (5.71)	0.077	21.6 (7.74)	24.6 (4.11)	17.6 (5.08)	21.1 (6.05)	0.909

Tabla 4.23 Concentración de proteínas totales, leptina y adiponectina en leche materna al segundo mes tras el parto. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el índice de masa corporal (IMC) materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. Cuando fue necesario se aplicó análisis post-hoc de Tukey y si se obtuvieron diferencias intergrupales, éstas se señalaron mediante letras como superíndices. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
	N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=21	N=8	N=15	N=11	
Proteínas (g/100mL)	0.45 (0.18)	0.43 (0.14)	0.50 (0.25)	0.269	0.47 (0.21)	0.44 (0.16)	0.549	0.41 (0.08)	0.60 (0.36)	0.45 (0.20)	0.42 (0.07)	0.041
Leptina (ng/mL)	0.34 (0.33)	0.20 (0.20)	0.60 (0.39)	<0.001	0.31 (0.31)	0.37 (0.36)	0.536	0.20 (0.13)	0.61 (0.45)	0.21 (0.27)	0.59 (0.36)	0.833
Adiponectina (ng/mL)	20.3 (8.02)	18.7 (4.62)	23.4 (11.8)	0.124	21.6 (9.76)	18.9 (5.31)	0.210	19.2 (4.56)	28.8 (16.7)	18.0 (4.78)	20.0 (5.99)	0.091

Tabla 4.24 Concentración de proteínas totales, leptina y adiponectina en leche materna al tercer mes tras el parto. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el índice de masa corporal (IMC) materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. Cuando fue necesario se aplicó análisis post-hoc de Tukey y si se obtuvieron diferencias intergrupales, éstas se señalaron mediante letras como superíndices. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Así como la composición corporal de la madre influye sobre los lípidos, los carbohidratos y el aporte calórico de la leche materna (361) y el sexo del lactante se ha relacionado con diferencias en el contenido energético de la misma (362), la influencia de ambos factores sobre las proteínas totales de la leche materna es un campo aún por explorar.

Hasta la fecha no está caracterizado el potencial efecto del IMC materno y/o del sexo del lactante sobre la concentración de proteínas totales en la leche materna (342), aunque un estudio en 1991 ha descrito su aumento con el peso para la altura materna (33). Aquí, observamos una relación inversa entre la ganancia de peso durante el embarazo y la concentración de proteínas en leche materna, de forma que a mayor ganancia de peso durante el embarazo, lo cual se dio sobretodo en mujeres normopeso, menores los niveles de proteínas en su leche ($R=-0.187$, $p=0.021$).

Por último observamos un efecto de la estación en la que tuvo lugar el parto sobre la concentración de proteínas en leche materna ($p=0.005$), de forma que las mujeres que parieron en invierno presentaron mayor concentración de proteínas que las que parieron en verano, especialmente en el primer mes tras el parto (Verano-Otoño= 0.46 ± 0.09 , Invierno-Primavera= 0.64 ± 0.25 ; $p<0.000$).

Los mayores niveles de proteínas descritos por otros autores en nacimientos pre-término (338) no fueron hallados en la población estudiada, si bien, dichas observaciones se refieren más habitualmente al calostro y leche de transición que a leche madura.

4.3.2.2 Concentración de proteínas bioactivas

Lactoferrina

La media poblacional para la concentración de lactoferrina al mes de lactancia fue de $1995\pm 787\mu\text{g/mL}$ (Tabla 4.22), similar a la concentración descrita previamente de $1700\mu\text{g/mL}$ (94) y dentro de los rangos observados en mujeres australianas ($970-1124\mu\text{g/mL}$ (111)) o de Estados Unidos ($864-6581\mu\text{g/mL}$ (110)).

No se observaron diferencias significativas asociadas al IMC materno ni al sexo del lactante, sin embargo, al estudiar la influencia de las variables de confusión se observaron diferencias significativas en función de si el nacimiento fue pre-término ($3622\mu\text{g/mL}$), a término ($1982\mu\text{g/mL}$, $p=0.039$) o post-término ($1643\mu\text{g/mL}$, $p=0.029$). La bibliografía presenta concentraciones inferiores en partos pre-término en comparación con partos a término o lo que es lo mismo una relación directamente proporcional entre las concentraciones de lactoferrina y la edad gestacional (111, 363, 364).

Recientemente, se ha revisado el potencial papel de la lactoferrina como mediador de la inflamación asociada a la obesidad (365), sugiriendo un posible rol en su modulación temprana a través de la leche. Sin embargo, en este estudio no identificamos asociaciones que pudieran sugerirnos ningún papel mediador entre el peso corporal materno, la ganancia de peso con el embarazo y el crecimiento de la descendencia para los niveles de lactoferrina en la leche materna (datos no mostrados).

Inmunoglobulina A

La media poblacional para la concentración de IgA al mes de lactancia fue de $489 \pm 227 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 4.22). Este valor se sitúa en el extremo inferior del rango de resultados disponible en la bibliografía consultada de $183\text{-}2724 \mu\text{g/mL}$ en leche madura (94, 110, 361, 363). Dependiendo de la etapa de lactancia los valores de IgA cambian considerablemente, con los niveles más altos en calostro (12mg/mL) seguido de una reducción progresiva y pronunciada que suele estabilizarse en los $1000 \mu\text{g/mL}$ en leche madura (59).

No se observaron diferencias significativas asociadas al IMC materno aunque han sido halladas en una población de madres lactantes en Brasil (361). Sin embargo, encontramos que a mayor ganancia de peso durante el embarazo, lo cual ocurrió más frecuentemente entre mujeres con normopeso, menores fueron las concentraciones de IgA en leche materna al mes de lactancia ($R=0.089$, $p=0.034$), lo cual va en concordancia con las observaciones del estudio referido y con la concentración de proteínas totales descritas anteriormente.

Por su parte, la concentración de IgA fue superior en leche de madres que tuvieron una niña frente a las que tuvieron un niño (580 vs $380 \mu\text{g/mL}$, $p=0.001$). También observamos diferencias significativas asociada a la ingesta de suplementos, concretamente las mujeres que los consumieron presentaron valores inferiores de IgA en leche frente a las que no los consumieron (429 vs $582 \mu\text{g/mL}$, $p=0.031$). Por último, se identificaron niveles superiores de IgA en leche cuando el parto tuvo lugar en Invierno-Primavera en comparación con Verano-Otoño (536 vs $397 \mu\text{g/mL}$, $p=0.014$).

Hasta la fecha no conocemos precedentes para las observaciones descritas sobre los niveles de IgA en leche materna.

Lisozima

La media poblacional para la concentración de lisozima al mes de lactancia fue de $233 \pm 317 \mu\text{g/mL}$, con una elevada variabilidad (rango de valores entre $19.4\text{-}1458.6 \mu\text{g/mL}$) (Tabla 4.22), si bien situada en el margen de concentraciones descrito por otros autores $15\text{-}500 \mu\text{g/mL}$ (94, 111, 363).

No se observaron diferencias significativas entre grupos por IMC materno ni sexo del lactante ni debido al resto de variables estudiadas a excepción de la ganancia de peso durante el embarazo que al igual que ocurrió con los niveles de IgA, los de lisozima fueron más bajos a mayores ganancias de peso corporal y por tanto entre las mujeres con normopeso antes del embarazo ($R=0.021$, $p=0.020$).

Leptina

La media poblacional para la concentración de leptina en cada una de las determinaciones fue de 0.38 ± 0.35 , 0.34 ± 0.31 y 0.34 ± 0.33 ng/mL, respectivamente para los meses 1, 2 y 3 tras el parto (Tabla 4.21). No se observaron cambios significativos en la evolución durante los tres primeros meses de lactancia, aunque previamente se ha descrito un descenso de la concentración de leptina en leche materna según avanza la lactancia (366) y especialmente durante el primer mes tras el parto (115).

Los niveles de leptina en leche materna se sitúan en un rango de 0.09-20 ng/mL variando según el mes de lactancia (367), la edad gestacional, el tamaño para la edad gestacional (115), el IMC materno (116), así como el tipo de metodología para su determinación y la fracción de leche utilizada (368). Así, encontramos que el rango dentro del cual se mueven las concentraciones de leptina en la muestra estudiada (0-1.2 ng/mL) coincidieron con los datos recogidos en poblaciones cercanas y con metodologías similares (131, 147, 366, 369).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de leptina asociadas al sexo del lactante. Se hallaron niveles de leptina más elevados en mujeres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ a lo largo del periodo estudiado ($p < 0.000$), presentando una correlación positiva entre el IMC materno y los niveles de leptina promedio de las tres determinaciones en leche materna (Figura 4.6). Las correlaciones entre la leptina en leche materna y el peso materno antes del embarazo ($R = 0.715$, $p < 0.000$) y al mes de lactancia ($R = 0.745$, $p < 0.000$) también resultaron significativas.

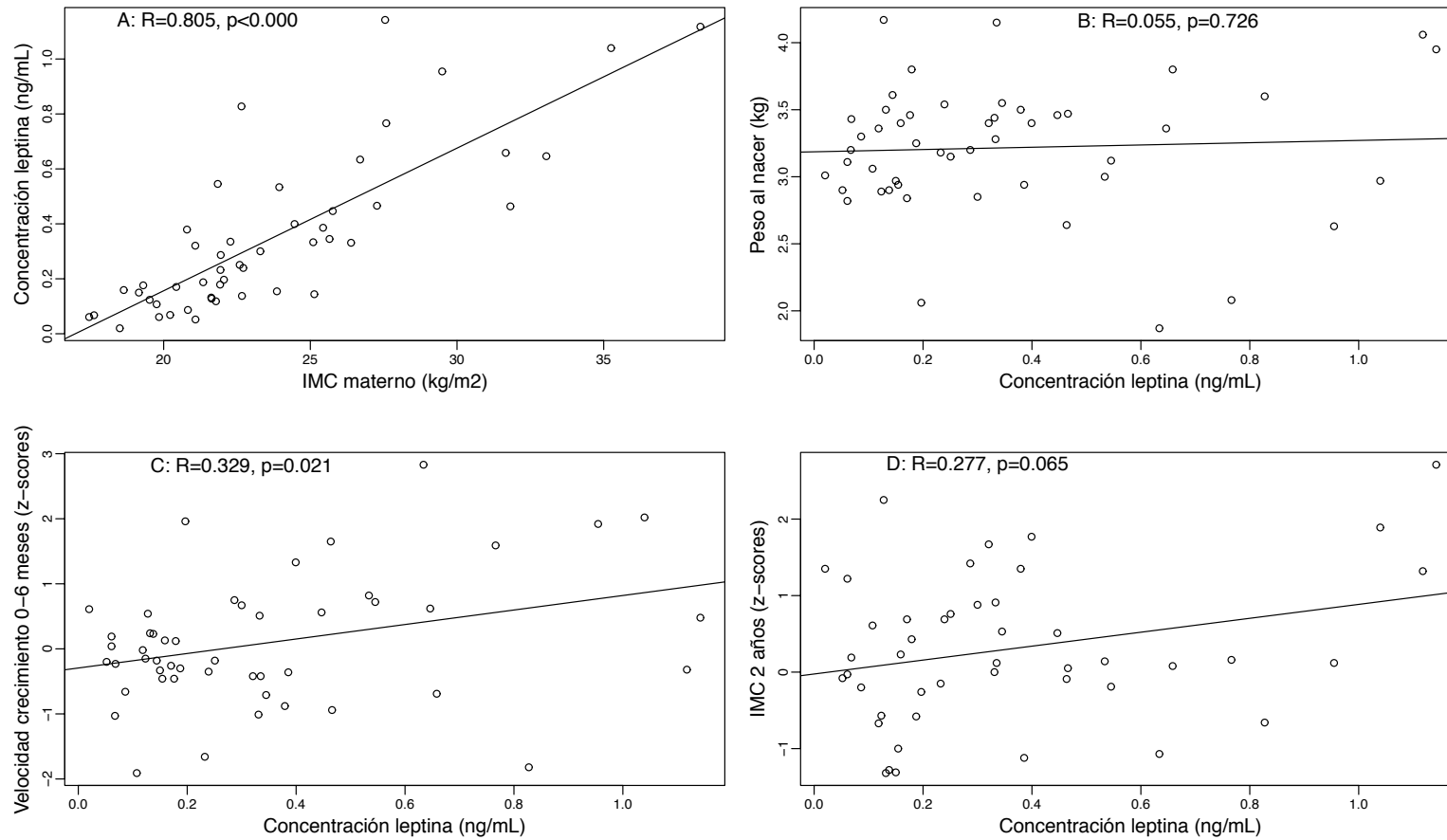


Figura 4.6 Correlaciones lineales entre la concentración de leptina en leche materna (promedio de los tres primeros meses de lactancia) y el índice de masa corporal materno (A), el peso al nacer (B), la velocidad de la ganancia de peso de 0 a 6 meses (C) y el índice de masa corporal (IMC) a los dos años de la descendencia (D). R, coeficiente de correlación lineal de Pearson; p= nivel de significancia de la correlación lineal.

En una revisión reciente que recoge concentraciones de leptina en leche materna de diversos estudios, diez de un total de quince presentaron una correlación positiva significativa con el IMC materno independientemente del momento en el que se registraron ambas variables y ninguno presentó una correlación negativa (116).

Al estudiar la influencia de los factores de confusión encontramos un efecto significativo del tipo de parto ($p < 0.001$), el tipo de lactancia ($p < 0.001$) y del tamaño para la edad gestacional ($p = 0.015$). Se observaron niveles de leptina más altos en madres con partos por cesárea, que siguieron lactancia mixta y que tuvieron hijos pequeños para su edad gestacional, datos que apuntan a la existencia de una interrelación entre estos factores en la población estudiada.

En estudios previos se han descrito niveles más elevados de leptina en leche materna de madres con partos a término en comparación con pre-término (370, 371) y en aquellas que tuvieron hijos con un tamaño adecuado o elevado para su edad gestacional en comparación con aquellos que presentaron un tamaño pequeño para su edad gestacional (115). Esta observación pone de manifiesto que en la cohorte estudiada los nacimientos con tamaño adecuado o grande se asociaron con niveles más altos de leptina en leche materna, contrariamente a lo que se ha observado previamente en otras poblaciones.

En lo relativo al tipo de lactancia, se ha observado previamente que los lactantes amamantados con leche materna presentan niveles de leptina en sangre superiores en comparación con lactancia artificial (372, 373). Aunque no podemos extrapolar niveles en sangre con niveles en leche materna, la conclusión de los autores en cuanto a que sus resultados indicarían mayores niveles de leptina ingerida en lactancia materna, no coincide con los resultados observados en esta población, donde se describen mayores niveles de leptina en leche de mujeres que siguieron lactancia mixta en comparación con las que siguieron lactancia exclusiva.

Cabe mencionar que hacen falta más estudios para poder llegar a establecer una descripción unánime de los niveles de leptina en leche materna y los factores determinantes.

Por último, observamos una correlación positiva entre los niveles de leptina en leche materna y la velocidad de crecimiento de 0 a 6 meses, así como sobre el IMC hacia los dos años de edad de la descendencia (Figura 4.6).

Previamente se han observado resultados opuestos en las correlaciones entre los niveles de leptina en leche materna y variables antropométricas de la descendencia (117, 131, 145, 147, 366, 369, 374, 375). En determinados estudios se observa que mayores niveles de leptina en leche materna se asocian a un aumento del peso corporal o el IMC en la descendencia (117, 374), si bien, en otros se muestra un cierto efecto protector sobre la acumulación de masa grasa corporal y la ganancia de peso durante los primeros seis meses de vida (31) y el IMC al primer

mes de lactancia (376). En cualquier caso, parece que la relación es dependiente del IMC materno y la evaluación de un efecto mediador de la transmisión de la obesidad materna a la descendencia para la leptina estaría pendiente de ser evaluado (ver capítulo 4.3.3.3).

Nuestros resultados muestran que las mujeres con un $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$ presentan mayores niveles de leptina en leche materna y ello se correlacionaría entonces con una mayor ganancia de peso corporal durante los primeros seis meses de vida, así como con un IMC más elevado a los dos años en la descendencia, pero en mujeres con $IMC < 25 \text{kg/m}^2$, este efecto no se observa (Figura 4.7).

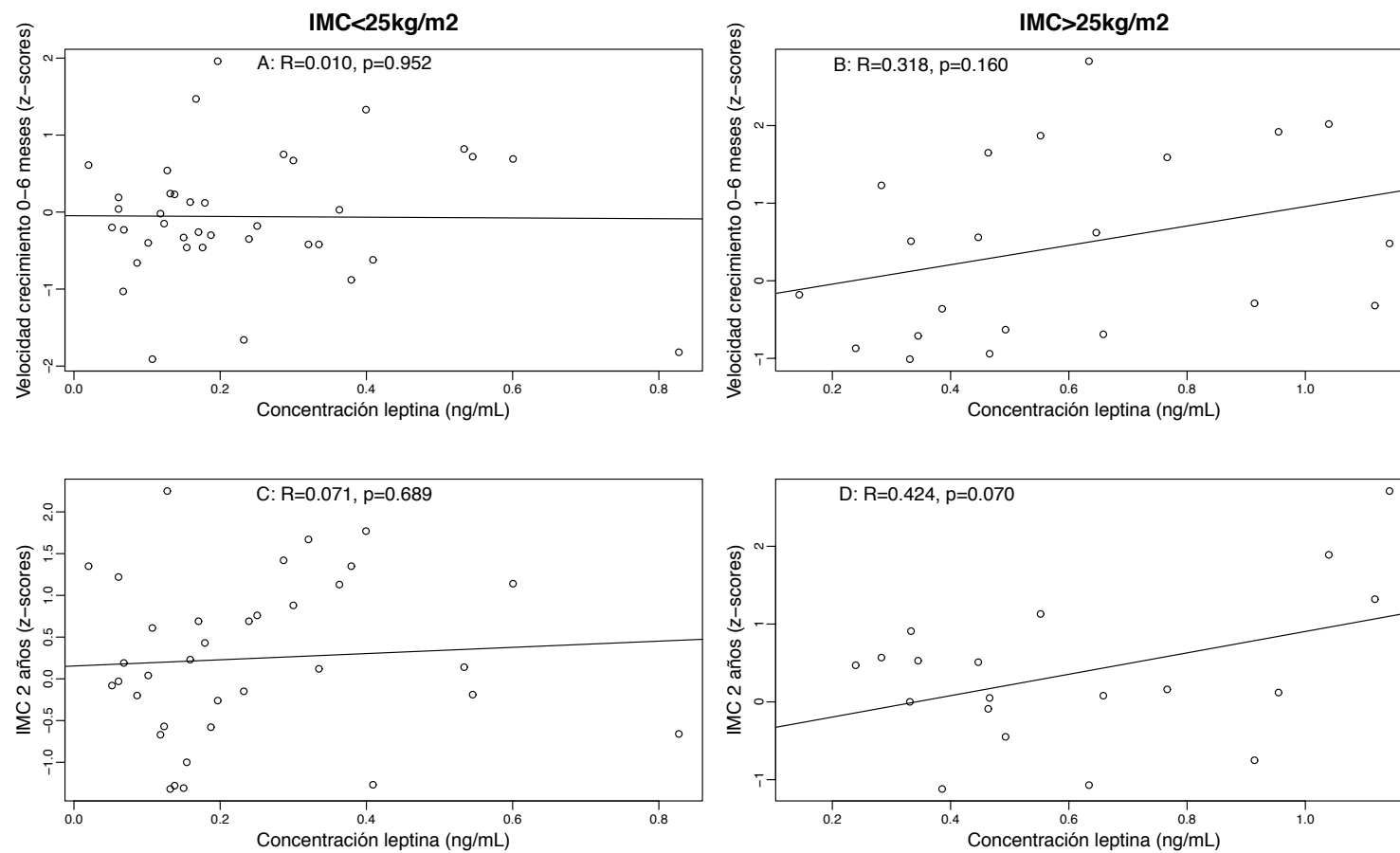


Figura 4.7 Correlaciones lineales entre la concentración de leptina en leche materna (promedio de los tres primeros meses de lactancia) y variables antropométricas de la descendencia (velocidad de la ganancia de peso de 0 a 6 meses (gráficas A y B) y el índice de masa corporal (IMC) a los dos años de edad (gráficas C y D)) en función del IMC materno (IMC<25kg/m² gráficas A y C, IMC≥25kg/m² gráficas B y D). R, coeficiente de correlación lineal de Pearson; p= nivel de significancia de la correlación lineal.

En un estudio previo también se observaron mayores niveles de leptina en la leche de mujeres que tuvieron bebés con un ritmo de crecimiento elevado ($>1\text{kg/mes}$) en comparación con el resto de grupos ($<0.5\text{kg/mes}$ y $0.5\text{-}1\text{kg/mes}$) (117). En nuestro grupo de investigación se ha postulado previamente un papel protector de la leptina frente al desarrollo de obesidad en la descendencia basándose en datos de mujeres normopeso (131).

Así, los resultados obtenidos en la cohorte estudiada en este caso si bien no confirman el efecto protector asociado a la leptina sobre la predisposición a la obesidad de la descendencia en mujeres con normopeso, señalan que cuando el IMC materno supera los 25kg/m^2 , un exceso de leptina en leche, se asociaría a mayor ganancia de peso e IMC a los dos años de edad, lo cual podría estar relacionado con una resistencia a su efecto.

Adiponectina

La media poblacional para la concentración de adiponectina en cada una de las determinaciones fue de 23.4 ± 7.6 , 20.8 ± 6.6 y $20.3\pm 8.0\text{ng/mL}$, respectivamente para los meses 1, 2 y 3 de lactancia (Tabla 4.21). No se observaron cambios significativos en la evolución aunque sí una tendencia a disminuir en función del tiempo ($p=0.066$). En la bibliografía encontramos datos contradictorios en cuanto a la evolución de los niveles de adiponectina en leche materna, aunque la mayor parte apuntan a una disminución según avanza la lactancia (115, 377).

El rango de concentraciones de esta proteína en leche materna descrito por otros autores va de $0.8\text{-}317\text{ng/mL}$, siendo el promedio más habitual de 19ng/mL (377). Nuestros resultados se mantuvieron muy cercanos a dicho promedio y todos los datos se situaron dentro del rango definido.

El IMC materno no se asoció con los niveles de adiponectina en leche materna (Figura 4.8) tal y como ha sido el caso en siete de nueve estudios evaluados recientemente desde que fue identificada en leche materna en 2006 (116, 378), a pesar de que algunos estudios previos sí han establecido correlaciones entre sus niveles y variables antropométricas maternas (128, 379). En general se han asociado menores niveles en suero y mayores en leche materna en mujeres con sobrepeso u obesidad (377), sin embargo, en la población estudiada no disponemos de datos en suero y los niveles de adiponectina en leche materna de mujeres con sobrepeso u obesidad no fueron mayores en comparación con mujeres normopeso.

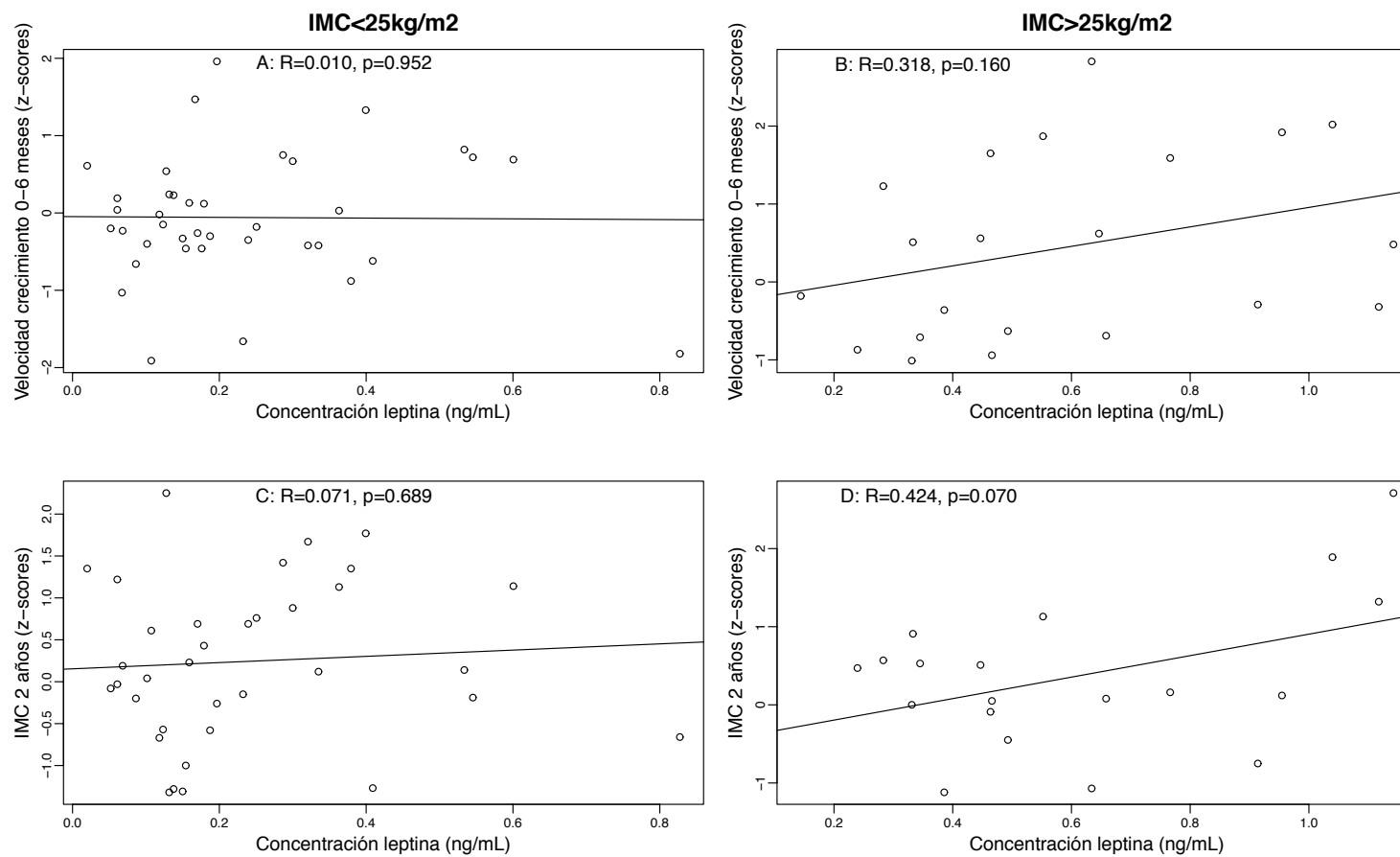


Figura 4.8 Correlaciones lineales entre la concentración de adiponectina en leche materna (promedio de los tres primeros meses de lactancia) y el índice de masa corporal materno (IMC) (A), el peso al nacer (B), la velocidad de la ganancia de peso de 0 a 6 meses (C) y el IMC a los dos años de la descendencia (D). R, coeficiente de correlación lineal de Pearson; p= nivel de significancia de la correlación lineal.

Por el contrario, se observaron diferencias asociadas al sexo del lactante (Tabla 4.21, $p=0.002$), con niveles más bajos en la leche de las mujeres que tuvieron un varón, y no tenemos constancia de que dicha observación haya sido reportada anteriormente. También observamos diferencias significativas entre grupos debido al tipo de lactancia ($p=0.020$) y el tamaño para la edad gestacional ($p=0.011$). Así la concentración de adiponectina en leche materna fue significativamente superior en mujeres que siguieron lactancia mixta, lo que va en oposición a los resultados obtenidos en un estudio previo (366), y los niveles también fueron mayores en mujeres que tuvieron niños pequeños/as para su edad gestacional.

Por último, observamos una correlación negativa entre los niveles de adiponectina en leche materna con el peso al nacer que ya ha sido observada previamente (366) y positiva con la ganancia de peso de 0 a 6 meses (Figura 4.8). Esta última observación es contraria a las presentadas por otros autores donde la asociación entre la adiponectina y la adiposidad infantil, el peso durante los primeros seis meses de lactancia (116) y la predisposición a padecer sobrepeso infantil hacia los dos años de edad (374) fue negativa. Es decir, a mayor concentración láctea de adiponectina ésta tendría un papel protector sobre el desarrollo de obesidad de la descendencia.

Recientemente se ha descrito un efecto diferencial de los niveles de adiponectina en leche materna sobre la composición corporal y las trayectorias de crecimiento infantil durante los primeros dos años de vida de forma que en etapas tempranas existe una asociación inversa entre las concentraciones de adiponectina y el crecimiento infantil que se revierte a partir de los cuatro meses, potenciando entonces la ganancia de peso y masa grasa corporal hasta los dos años de edad (145).

Estas observaciones irían en concordancia con los resultados en la población estudiada donde encontramos una correlación inversa entre los niveles de adiponectina en leche materna y el peso al nacer pero positiva con la ganancia de peso durante los primeros seis meses de vida. Además, no se observó correlación con el IMC hacia los dos años de edad, lo cual coincide con las asociaciones encontradas por otros autores durante los primeros meses de lactancia que luego desaparecen hacia los dos años de edad.

En definitiva, los niveles de adiponectina en leche materna no parecen estar asociados al IMC materno pero sí presentan dimorfismo sexual. En cuanto al efecto que pudiera tener sobre el crecimiento infantil, éste estaría delimitado a la primera etapa de lactancia y niveles más altos se asociarían con pesos al nacer inferiores que luego siguen trayectorias en la ganancia de peso corporal más pronunciadas según los resultados obtenidos en la cohorte estudiada.

4.3.2.3 Concentración de aminoácidos libres

El perfil de aminoácidos libres de la leche materna se detalla en las Tablas 4.25-28 para cada uno de los meses así como las diferencias ligadas al IMC materno y el sexo del lactante. Se incluyen ratios y agrupaciones de acuerdo a su dependencia de la dieta y sus características bioquímicas que son de interés en la comparación e interpretación de los resultados. Además la Tabla 4.25 presenta los resultados del análisis longitudinal de la influencia de las variables de confusión del estudio sobre los niveles de aminoácidos en leche materna madura. Se identificaron un total de 20 aminoácidos. El primer mes de lactancia se determinaron 23 muestras y el segundo y tercer mes se procesaron 55 muestras.

(pMol/μl)		Total N=133	Mes 1 N=23	Mes 2 N=55	Mes 3 N=55	p-valor											
						Tiempo	IMC	GPE	Sexo	TP	PP	EG	Pre/post término	CS	EP	TL	
ASP	Ácido aspártico	62.9 (31.9)	53.9 (26.4)	61.0 (31.9)	68.5 (33.4)												
GLU	Ácido glutámico	1533 (457)	1374 (488)	1530 (480)	1604 (408)			0.029		0.001	0.001						
ASN	Asparagina	20.7 (10.1)	16.9 (5.78)	21.2 (10.5)	21.6 (11.0)												
SER	Serina	123 (45.4)	101 (38.5)	120 (45.9)	134 (44.7)	0.008				0.005							
GLN	Glutamina	541 (256)	347 (164)	510 (231)	652 (258)	0.000	0.001			0.008							
HIS	Histidina	42.4 (8.64)	44.6 (11.4)	41.7 (8.56)	42.2 (7.34)												
GLY	Glicina	124 (44.0)	119 (62.0)	122 (41.6)	128 (37.4)		0.014	0.032			0.024	0.010					
THR	Treonina	95.4 (36.7)	85.8 (30.1)	93.6 (36.5)	101 (39.0)					0.001	0.021						
ARG	Arginina	36.8 (25.8)	34.7 (10.5)	39.2 (36.4)	35.5 (17.4)		0.010					0.034	0.001				
ALA	Alanina	238 (75.6)	244 (73.7)	231 (89.8)	242 (60.1)			0.029				0.043	0.008				
TAU	Taurina	287 (122)	326 (137)	278 (126)	280 (109)		0.016		0.001	0.019	0.012						
TYR	Tirosina	33.9 (11.8)	33.2 (10.0)	34.9 (15.0)	33.3 (8.57)		0.006						0.016	0.043			
CYS	Cisteína	43.4 (12.0)	41.7 (18.1)	43.3 (10.7)	44.1 (10.3)						0.049						
VAL	Valina	58.1 (24.6)	50.5 (10.0)	60.4 (33.2)	59.0 (17.9)							0.003	0.001				
MET	Metionina	68.3 (23.8)	69.9 (28.1)	69.7 (24.2)	66.1 (21.5)											0.047	
TRP	Triptófano	37.6 (10.1)	37.6 (8.68)	38.0 (12.1)	37.1 (8.50)							0.020	0.008				
PHE	Fenilalanina	31.9 (17.7)	27.6 (5.96)	32.4 (18.4)	32.9 (19.7)		0.023					0.000	0.000				0.028
ILE	Isoleucina	29.3 (15.9)	26.5 (6.87)	31.5 (22.2)	28.4 (10.7)		0.031					0.011	0.018				

(pMol/ μ l)		Total N=133	Mes 1 N=23	Mes 2 N=55	Mes 3 N=55	p-valor										
						Tiempo	IMC	GPE	Sexo	TP	PP	EG	Pre/post término	CS	EP	TL
LEU	Leucina	53.0 (46.6)	41.6 (11.0)	57.1 (60.1)	53.9 (40.4)		0.014					0.001	0.000			
LYS	Lisina	57.3 (33.8)	53.8 (13.6)	59.1 (42.4)	57.0 (30.7)		0.008					0.036	0.002			
AaLT	Aminoácidos libres totales	3474 (869)	3089 (847)	3419 (961)	3689 (719)	0.025		0.028		0.000	0.001	0.011	0.004			
AaE	Aminoácidos esenciales	457 (170)	443 (87.7)	455 (220)	463 (139)							0.002	0.000	0.048		
AaSE	Aminoácidos semi-esenciales	105 (40.9)	103 (34.8)	107 (52.0)	103 (30.2)		0.002				0.033		0.028			
AaNE	Aminoácidos no esenciales	2994 (790)	2646 (797)	2935 (843)	3199 (677)	0.017		0.044		0.000	0.001	0.041				
AaR	Aminoácidos ramificados	136 (84.6)	116 (25.1)	142 (113)	139 (64.7)		0.034					0.001	0.000			
AaS	Aminoácidos sulfurados	397 (130)	436 (145)	389 (135)	389 (118)		0.024	0.046	0.000	0.020	0.005					
TRP/AaLN	Triptófano/Aminoácidos largos neutros	0.20 (0.07)	0.24 (0.09)	0.20 (0.07)	0.19 (0.05)		0.007				0.039					0.038

Tabla 4.25 Concentraciones de aminoácidos individuales (pMol/ μ l) identificados por cromatografía líquida de alta resolución, ratios y sumatorios de los grupos considerados relevantes en leche materna durante los primeros tres meses consecutivos tras el parto. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar. AaLT, sumatorio del total de aminoácidos identificados; AaE, histidina+treonina+valina+metionina+triptófano+fenilalanina+isoleucina+leucina+lisina; AaSE, arginina+tirosina+cisteína; AaNE, alanina+glicina+aspartato+glutamato+glutamina+taurina+prolina+asparagina+serina; AaR, isoleucina+leucina+valina; AaS, taurina+cisteína+metionina; AaLN, tirosina+fenilalanina+leucina+isoleucina+valina. El análisis estadístico principal responde a ANOVA de medidas repetidas. Se incluye el análisis por modelo lineal mixto para la evaluación longitudinal del efecto de los factores de interés (IMC materno y sexo del lactante), así como los efectos de los factores de confusión (ganancia de peso con el embarazo (GPE), tipo de parto (TP), partos previos (PP), edad gestacional (EG), nacimientos pre-/post- o a término, consumo de suplementos (CS), estación del parto (EP), tipo de lactancia (TL)). El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$. No se muestran los resultados que no alcanzaron la significancia estadística.

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(pMol/μl)		N=23	N=18	N=5		N=13	N=10		N=11	N=2	N=7	N=3	
ASP	Ácido aspártico	53.9 (26.4)	59.2 (27.0)	35.8 (13.9)	0.021	54.0 (30.2)	53.8 (22.6)	0.985	57.6 (31.8)	36.1 (12.0)	61.6 (20.5)	35.5 (17.7)	0.868
GLU	Ácido glutámico	1374 (488)	1311 (415)	1598 (705)	0.426	1356 (599)	1396 (321)	0.839	1228 (491)	2062 (843)	1442 (231)	1288 (527)	0.051
ASN	Asparagina	16.9 (5.78)	16.3 (6.04)	19.2 (4.83)	0.441	17.2 (6.09)	16.1 (5.58)	0.754	17.1 (6.55)	17.4 (5.21)	13.9 (4.11)	22.8 (.)	0.325
SER	Serina	101 (38.5)	96.0 (28.6)	119 (64.1)	0.466	104 (46.2)	97.2 (27.1)	0.663	93.1 (29.6)	164 (91.3)	100 (28.6)	89.7 (27.2)	0.036
GLN	Glutamina	347 (164)	357 (135)	312 (263)	0.728	302 (165)	405 (152)	0.137	309 (143)	264 (342)	431 (82.4)	343 (275)	0.805
HIS	Histidina	44.6 (11.4)	46.5 (11.7)	37.7 (7.39)	0.067	46.4 (13.2)	42.2 (8.64)	0.365	46.8 (14.4)	44.2 (2.23)	46.0 (6.65)	33.4 (6.05)	0.402
GLY	Glicina	119 (62.0)	107 (26.3)	165 (122)	0.347	128 (80.3)	108 (23.3)	0.416	106 (26.4) ^a	249 (189) ^b	108 (28.1) ^a	109 (8.47) ^a	0.013
THR	Treonina	85.8 (30.1)	85.9 (30.7)	85.2 (31.6)	0.968	91.9 (31.3)	77.8 (28.0)	0.268	90.0 (33.8)	102 (8.92)	79.4 (26.0)	73.9 (38.4)	0.589
ARG	Arginina	34.7 (10.5)	32.9 (7.60)	40.1 (16.5)	0.391	37.6 (13.2)	31.1 (4.26)	0.153	33.4 (9.58) ^a	56.4 (12.1) ^b	32.1 (3.67) ^a	29.3 (5.55) ^a	0.007
ALA	Alanina	244 (73.7)	247 (70.9)	231 (91.0)	0.74	270 (81.3)	209 (45.3)	0.031	267 (76.8)	291 (139)	216 (50.5)	192 (31.4)	0.519
TAU	Taurina	326 (137)	326 (129)	325 (178)	0.994	375 (141)	262 (105)	0.039	374 (115)	382 (328)	251 (120)	287 (66.4)	0.838
TYR	Tirosina	33.2 (10.0)	32.6 (9.82)	35.5 (11.6)	0.633	35.3 (12.6)	30.6 (4.52)	0.224	33.4 (12.4)	45.7 (9.67)	31.4 (3.61)	28.6 (6.72)	0.152
CYS	Cisteína	41.7 (18.1)	37.9 (9.42)	59.0 (36.3)	0.329	46.3 (22.4)	35.2 (5.58)	0.108	40.4 (11.1)	78.4 (48.3)	33.9 (3.80)	39.6 (10.5)	0.060
VAL	Valina	50.5 (10.0)	50.0 (9.70)	52.4 (12.1)	0.706	50.5 (10.9)	50.6 (9.27)	0.971	48.4 (10.5)	62.0 (3.46)	52.6 (8.26)	46.0 (11.7)	0.059
MET	Metionina	69.9 (28.1)	69.8 (27.3)	70.3 (34.3)	0.98	73.2 (33.5)	65.7 (20.0)	0.508	68.3 (34.2)	100 (2.29)	72.2 (12.0)	50.4 (29.4)	0.074
TRP	Triptófano	37.6 (8.68)	39.9 (8.26)	30.1 (5.97)	0.079	38.6 (8.56)	36.5 (9.48)	0.678	39.4 (9.11)	34.1 (.)	40.6 (8.07)	28.2 (6.92)	0.561

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(pMol/μl)		N=23	N=18	N=5		N=13	N=10		N=11	N=2	N=7	N=3	
PHE	Fenilalanina	27.6 (5.96)	27.1 (5.48)	29.3 (8.13)	0.647	28.8 (6.86)	26.4 (5.00)	0.397	26.8 (6.20)	35.9 (4.18)	27.4 (5.15)	22.7 (2.38)	0.041
ILE	Isoleucina	26.5 (6.87)	26.7 (6.75)	25.5 (8.37)	0.798	28.5 (7.93)	23.8 (4.11)	0.093	28.2 (8.03)	30.4 (10.2)	24.7 (4.02)	20.7 (3.62)	0.428
LEU	Leucina	41.6 (11.0)	40.2 (8.78)	46.6 (17.1)	0.459	45.2 (12.8)	36.8 (5.53)	0.05	41.7 (10.6) ^a	64.2 (0.57) ^b	37.7 (4.35) ^a	34.9 (8.51) ^a	0.010
LYS	Lisina	53.8 (13.6)	54.0 (13.4)	53.1 (15.9)	0.91	58.8 (15.5)	47.2 (6.80)	0.026	57.0 (16.0)	68.9 (8.52)	49.2 (6.01)	42.5 (7.25)	0.165
AaLT	Aminoácidos libres totales	3089 (847)	3023 (676)	3328 (1383)	0.655	3147 (1030)	3015 (573)	0.701	2960 (799)	4171 (1964)	3122 (460)	2766 (843)	0.082
AaE	Aminoácidos esenciales	443 (87.7)	442 (76.6)	447 (131)	0.939	465 (91.6)	415 (77.7)	0.175	444 (82.7) ^a	581 (21.3) ^b	440 (72.4) ^a	358 (66.4) ^c	0.011
AaSE	Aminoácidos semi-esenciales	103 (34.8)	97.9 (23.5)	123 (60.8)	0.417	113 (41.3)	90.2 (18.5)	0.089	101 (27.7) ^a	180 (45.9) ^b	92.8 (15.1) ^a	84.3 (28.1) ^a	0.004
AaNE	Aminoácidos no esenciales	2646 (797)	2581 (628)	2881 (1316)	0.644	2682 (979)	2600 (520)	0.799	2517 (750)	3590 (1985)	2682 (401)	2408 (811)	0.115
AaR	Aminoácidos ramificados	116 (25.1)	115 (20.5)	119 (40.6)	0.844	122 (27.4)	109 (20.6)	0.203	116 (24.5) ^a	156 (14.2) ^b	115 (13.8) ^a	94.6 (30.0) ^c	0.014
AaS	Aminoácidos sulfurados	436 (145)	434 (122)	443 (228)	0.935	494 (141)	359 (116)	0.02	482 (91.7)	560 (379)	357 (131)	364 (96.7)	0.620
TRP/AaLN	Triptófano/Aminoácidos largos neutros	0.24 (0.09)	0.26 (0.09)	0.16 (0.02)	0.015	0.27 (0.11)	0.20 (0.04)	0.176	0.29 (0.11)	0.15 (.)	0.21 (0.04)	0.17 (0.03)	0.453

Tabla 4.26 Concentraciones de aminoácidos individuales (pMol/μl), ratios y sumatorios de los grupos considerados relevantes en leche materna al primer mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. AaLT, sumatorio del total de aminoácidos identificados; AaE, histidina+treonina+valina+metionina+triptófano+fenilalanina+isoleucina+leucina+lisina; AaSE, arginina+tirosina+cisteína; AaNE, alanina+glicina+aspartato+glutamato+glutamina+taurina+prolina+asparagina+serina; AaR, isoleucina+leucina+valina; AaS, taurina+cisteína+metionina; AaLN, tirosina+fenilalanina+leucina+isoleucina+valina. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. Cuando fue necesario se aplicó análisis post-hoc de Tukey y si se obtuvieron diferencias inter-grupales, éstas se señalaron mediante letras como superíndices. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(pMol/μl)		N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=22	N=7	N=14	N=12	
ASP	Ácido aspártico	61.0 (31.9)	59.9 (36.2)	63.0 (22.2)	0.699	58.9 (35.4)	63.4 (27.8)	0.612	58.8 (38.6)	59.3 (26.0)	61.7 (33.5)	65.4 (20.4)	0.871
GLU	Ácido glutámico	1530 (480)	1579 (515)	1437 (402)	0.265	1540 (497)	1518 (469)	0.865	1539 (549)	1543 (318)	1641 (469)	1374 (445)	0.345
ASN	Asparagina	21.2 (10.5)	23.4 (11.3)	15.8 (5.67)	0.019	23.2 (13.6)	19.1 (5.40)	0.286	25.7 (13.9)	12.4 (3.84)	20.2 (5.07)	17.5 (5.93)	0.219
SER	Serina	120 (45.9)	126 (47.3)	108 (41.8)	0.175	119 (51.5)	121 (39.4)	0.928	126 (51.1)	97.1 (49.5)	125 (42.3)	115 (36.8)	0.460
GLN	Glutamina	510 (231)	559 (231)	416 (205)	0.023	536 (253)	480 (204)	0.369	584 (253)	385 (198)	520 (193)	435 (215)	0.386
HIS	Histidina	41.7 (8.56)	41.1 (7.14)	42.8 (11.0)	0.539	41.5 (9.18)	41.8 (7.96)	0.904	41.0 (8.16)	43.0 (12.5)	41.1 (5.45)	42.7 (10.6)	0.946
GLY	Glicina	122 (41.6)	117 (41.8)	130 (41.1)	0.297	117 (38.1)	128 (45.4)	0.339	111 (32.3)	133 (51.9)	127 (53.4)	128 (35.3)	0.409
THR	Treonina	93.6 (36.5)	96.4 (36.9)	87.9 (36.1)	0.425	94.0 (39.3)	93.1 (33.8)	0.93	96.9 (41.7)	84.7 (31.4)	95.6 (29.1)	90.0 (40.2)	0.765
ARG	Arginina	39.2 (36.4)	30.5 (6.45)	52.8 (56.0)	0.132	43.4 (48.3)	35.2 (20.0)	0.487	31.7 (7.25)	65.1 (80.1)	29.1 (5.45)	43.3 (28.8)	0.403
ALA	Alanina	231 (89.8)	228 (75.1)	239 (115)	0.71	233 (103)	230 (74.3)	0.891	222 (80.7)	267 (158)	236 (67.3)	222 (84.1)	0.267
TAU	Taurina	278 (126)	303 (131)	231 (104)	0.032	312 (123)	241 (121)	0.038	321 (129)	284 (110)	276 (135)	201 (91.9)	0.596
TYR	Tirosina	34.9 (15.0)	32.0 (7.39)	40.8 (23.4)	0.148	35.7 (19.0)	34.0 (8.60)	0.685	32.7 (9.17)	44.5 (35.1)	31.0 (3.38)	38.3 (11.8)	0.614
CYS	Cisteína	43.3 (10.7)	44.9 (11.4)	40.2 (8.38)	0.093	44.5 (9.85)	42.0 (11.6)	0.408	45.5 (10.3)	41.2 (7.95)	43.9 (13.3)	39.5 (8.95)	0.981
VAL	Valina	60.4 (33.2)	55.1 (15.2)	71.1 (52.8)	0.225	61.3 (31.9)	59.5 (35.3)	0.845	56.8 (17.2)	75.5 (58.4)	52.6 (11.7)	68.2 (51.6)	0.876
MET	Metionina	69.7 (24.2)	67.2 (22.0)	74.7 (28.2)	0.333	70.5 (29.9)	68.9 (15.9)	0.802	66.2 (26.4)	84.1 (38.2)	68.9 (13.1)	68.8 (19.5)	0.215
TRP	Triptófano	38.0 (12.1)	36.2 (7.14)	41.4 (18.2)	0.338	37.7 (13.6)	38.2 (10.7)	0.903	36.0 (8.02)	43.0 (24.6)	36.5 (5.99)	40.4 (14.9)	0.717
PHE	Fenilalanina	32.4 (18.4)	29.0 (7.82)	38.8 (28.8)	0.184	32.8 (21.9)	32.0 (14.4)	0.874	29.3 (9.58)	44.0 (42.1)	28.5 (4.48)	36.0 (20.4)	0.529
ILE	Isoleucina	31.5 (22.2)	27.4 (12.0)	39.9 (33.7)	0.168	31.2 (18.6)	32.0 (26.6)	0.907	28.6 (14.6)	40.0 (28.8)	24.9 (4.00)	39.8 (37.8)	0.806

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(pMol/μl)		N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=22	N=7	N=14	N=12	
LEU	Leucina	57.1 (60.1)	46.4 (18.2)	77.8 (98.5)	0.197	59.5 (67.7)	54.4 (51.6)	0.756	49.1 (21.9)	90.6 (132)	42.3 (10.1)	69.7 (76.1)	0.692
LYS	Lisina	59.1 (42.4)	50.8 (16.7)	75.1 (67.2)	0.149	62.0 (53.0)	55.8 (26.6)	0.592	51.6 (21.5)	93.0 (97.9)	49.6 (4.00)	63.7 (39.4)	0.270
AaLT	Aminoácidos libres totales	3419 (961)	3511 (905)	3245 (1061)	0.361	3509 (1015)	3319 (905)	0.465	3507 (1020)	3517 (1079)	3517 (725)	3087 (1064)	0.443
AaE	Aminoácidos esenciales	455 (220)	430 (98.7)	504 (350)	0.378	468 (235)	441 (206)	0.652	434 (113)	574 (443)	422 (74.2)	463 (298)	0.448
AaSE	Aminoácidos semi-esenciales	107 (52.0)	97.2 (25.5)	126 (80.7)	0.16	109 (66.0)	104 (29.7)	0.737	95.5 (28.5)	151 (122)	99.9 (20.7)	110 (38.7)	0.092
AaNE	Aminoácidos no esenciales	2935 (843)	3060 (859)	2697 (777)	0.121	3011 (904)	2849 (777)	0.478	3054 (978)	2878 (663)	3070 (665)	2592 (846)	0.544
AaR	Aminoácidos ramificados	142 (113)	125 (44.1)	175 (182)	0.251	148 (115)	135 (113)	0.687	131 (52.0)	200 (219)	114 (26.3)	160 (165)	0.715
AaS	Aminoácidos sulfurados	389 (135)	415 (136)	340 (121)	0.043	427 (125)	348 (136)	0.03	432 (128)	409 (123)	389 (149)	300 (105)	0.391
TRP/AaLN	Triptófano/Aminoácidos largos neutros	0.20 (0.07)	0.22 (0.08)	0.18 (0.06)	0.105	0.21 (0.08)	0.20 (0.06)	0.63	0.22 (0.09)	0.17 (0.05)	0.21 (0.05)	0.18 (0.07)	0.570

Tabla 4.27 Concentraciones de aminoácidos individuales (pMol/μl), ratios y sumatorios de los grupos considerados relevantes en leche materna al segundo mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. AaLT, sumatorio del total de aminoácidos identificados; AaE, histidina+treonina+valina+metionina+triptófano+fenilalanina+isoleucina+leucina+lisina; AaSE, arginina+tirosina+cisteína; AaNE, alanina+glicina+aspartato+glutamato+glutamina+taurina+prolina+asparagina+serina; AaR, isoleucina+leucina+valina; AaS, taurina+cisteína+metionina; AaLN, tirosina+fenilalanina+leucina+isoleucina+valina. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. Cuando fue necesario se aplicó análisis post-hoc de Tukey y si se obtuvieron diferencias inter-grupales, éstas se señalaron mediante letras como superíndices. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(pMol/μl)		N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=21	N=8	N=15	N=11	
ASP	Ácido aspártico	68.5 (33.4)	66.7 (31.5)	71.9 (37.5)	0.624	69.0 (31.5)	67.9 (36.0)	0.908	69.0 (28.1)	68.9 (42.9)	63.3 (36.9)	73.7 (35.7)	0.606
GLU	Ácido glutámico	1604 (408)	1631 (428)	1552 (372)	0.483	1612 (404)	1594 (419)	0.87	1655 (408)	1501 (399)	1597 (467)	1590 (366)	0.542
ASN	Asparagina	21.6 (11.0)	21.5 (11.4)	22.0 (10.4)	0.913	24.4 (13.5)	18.4 (5.98)	0.079	24.3 (13.4)	24.6 (16.2)	17.6 (6.32)	20.2 (5.28)	0.775
SER	Serina	134 (44.7)	141 (42.1)	121 (47.8)	0.143	139 (46.1)	128 (43.2)	0.363	149 (33.9)	113 (64.5)	129 (50.3)	127 (33.4)	0.189
GLN	Glutamina	652 (258)	712 (255)	539 (229)	0.014	694 (279)	606 (229)	0.202	757 (251)	529 (296)	649 (255)	546 (182)	0.382
HIS	Histidina	42.2 (7.34)	42.4 (6.95)	41.8 (8.22)	0.795	44.0 (7.68)	40.3 (6.56)	0.06	44.2 (6.96)	43.2 (9.83)	39.9 (6.30)	40.8 (7.15)	0.631
GLY	Glicina	128 (37.4)	123 (34.2)	137 (42.0)	0.204	122 (33.4)	134 (41.2)	0.246	120 (26.2)	130 (49.0)	128 (43.7)	143 (37.6)	0.796
THR	Treonina	101 (39.0)	105 (38.1)	93.9 (40.5)	0.324	107 (42.7)	94.6 (34.1)	0.228	111 (42.7)	98.5 (44.3)	97.6 (30.7)	90.6 (39.4)	0.809
ARG	Arginina	35.5 (17.4)	32.4 (13.6)	39.7 (21.1)	0.213	38.6 (21.4)	32.4 (11.9)	0.252	35.6 (17.6)	43.6 (27.0)	28.7 (4.81)	36.5 (15.9)	0.987
ALA	Alanina	242 (60.1)	244 (64.1)	238 (53.2)	0.736	250 (67.0)	233 (51.4)	0.303	255 (69.1)	237 (63.4)	229 (55.1)	240 (47.8)	0.407
TAU	Taurina	280 (109)	296 (110)	250 (105)	0.14	306 (95.0)	251 (118)	0.063	316 (94.0)	282 (99.7)	268 (127)	227 (107)	0.907
TYR	Tirosina	33.3 (8.57)	31.7 (8.26)	36.2 (8.55)	0.068	34.1 (10.8)	32.4 (5.40)	0.449	32.6 (10.3)	38.0 (11.6)	30.5 (4.37)	35.0 (5.80)	0.847
CYS	Cisteína	44.1 (10.3)	44.1 (9.42)	44.2 (12.2)	0.975	44.2 (9.47)	44.0 (11.3)	0.958	44.0 (8.97)	44.8 (11.6)	44.2 (10.3)	43.8 (13.1)	0.860
VAL	Valina	59.0 (17.9)	58.7 (16.9)	59.5 (20.0)	0.876	62.1 (21.9)	55.5 (11.3)	0.164	61.9 (19.4)	62.4 (29.1)	54.1 (11.7)	57.4 (10.8)	0.778
MET	Metionina	66.1 (21.5)	65.4 (22.3)	67.5 (20.4)	0.725	65.6 (24.0)	66.6 (18.8)	0.859	63.9 (27.9)	70.1 (7.28)	67.4 (11.2)	65.6 (26.5)	0.526
TRP	Triptófano	37.1 (8.50)	36.7 (7.27)	37.8 (10.2)	0.711	37.3 (9.41)	36.9 (7.45)	0.86	36.5 (8.22)	39.3 (12.2)	37.1 (5.33)	36.7 (9.09)	0.572
PHE	Fenilalanina	32.9 (19.7)	30.6 (13.4)	37.2 (27.6)	0.338	33.2 (17.0)	32.6 (22.7)	0.909	32.5 (17.2)	35.2 (17.6)	27.9 (3.21)	38.6 (34.0)	0.495
ILE	Isoleucina	28.4 (10.7)	27.2 (8.21)	30.5 (13.9)	0.354	29.2 (9.31)	27.6 (12.2)	0.612	28.8 (9.86)	30.1 (8.37)	24.9 (4.33)	30.8 (17.3)	0.481

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(pMol/μl)		N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=21	N=8	N=15	N=11	
LEU	Leucina	53.9 (40.4)	48.9 (26.4)	63.3 (58.2)	0.318	53.9 (37.0)	53.8 (44.6)	0.986	51.4 (33.9)	60.7 (46.0)	45.4 (9.09)	65.2 (67.9)	0.657
LYS	Lisina	57.0 (30.7)	52.0 (18.6)	66.6 (44.8)	0.187	60.6 (41.1)	53.1 (10.7)	0.351	52.6 (24.1)	81.5 (66.3)	51.1 (5.31)	55.8 (15.3)	0.164
AaLT	Aminoácidos libres totales	3689 (719)	3772 (723)	3532 (705)	0.24	3793 (746)	3573 (684)	0.258	3902 (688)	3509 (864)	3592 (755)	3548 (609)	0.403
AaE	Aminoácidos esenciales	463 (139)	447 (112)	494 (178)	0.305	479 (150)	446 (125)	0.386	464 (134)	516 (192)	423 (69.9)	478 (175)	0.963
AaSE	Aminoácidos semi-esenciales	103 (30.2)	96.5 (29.9)	116 (27.3)	0.021	104 (33.9)	103 (26.2)	0.902	97.1 (34.2)	121 (28.0)	95.7 (23.6)	112 (27.6)	0.142
AaNE	Aminoácidos no esenciales	3199 (677)	3304 (672)	3000 (657)	0.114	3287 (712)	3101 (635)	0.31	3415 (647)	2950 (807)	3148 (698)	3036 (564)	0.362
AaR	Aminoácidos ramificados	139 (64.7)	132 (49.4)	153 (86.6)	0.326	143 (66.3)	135 (63.9)	0.634	139 (60.9)	153 (82.6)	121 (24.1)	153 (93.5)	0.624
AaS	Aminoácidos sulfurados	389 (118)	405 (118)	359 (115)	0.173	415 (101)	361 (131)	0.101	423 (101)	391 (102)	380 (137)	337 (123)	0.872
TRP/AaLN	Triptófano/Aminoácidos largos neutros	0.19 (0.05)	0.20 (0.04)	0.18 (0.05)	0.178	0.19 (0.04)	0.19 (0.05)	0.77	0.20 (0.04)	0.18 (0.04)	0.21 (0.04)	0.18 (0.06)	0.650

Tabla 4.28 Concentraciones de aminoácidos individuales (pMol/μl), ratios y sumatorios de los grupos considerados relevantes en leche materna al tercer mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. AaLT, sumatorio del total de aminoácidos identificados; AaE, histidina+treonina+valina+metionina+triptófano+fenilalanina+isoleucina+leucina+lisina; AaSE, arginina+tirosina+cisteína; AaNE, alanina+glicina+aspartato+glutamato+glutamina+taurina+prolina+asparagina+serina; AaR, isoleucina+leucina+valina; AaS, taurina+cisteína+metionina; AaLN, tirosina+fenilalanina+leucina+isoleucina+valina. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. Cuando fue necesario se aplicó análisis post-hoc de Tukey y si se obtuvieron diferencias inter-grupales, éstas se señalaron mediante letras como superíndices. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Evolución de la concentración de aminoácidos libres

La media poblacional para el total de aminoácidos libres identificados en cada una de las determinaciones fue de 3089 ± 847 , 3419 ± 961 y 3689 ± 719 pMol/ μ L, respectivamente para los meses 1, 2 y 3 de lactancia (Tabla 4.25). Se identificó un aumento significativo del total de aminoácidos libres (AaLT, $p=0.025$), a lo largo de los tres meses de lactancia, que fue significativo para la serina ($p=0.008$) y la glutamina ($p=0.000$).

Previamente se ha reportado una disminución del total de aminoácidos libres en la leche materna con el avance de la lactancia, causado por una disminución de prácticamente todos los aminoácidos a excepción del ácido glutámico y la glutamina que aumentan de manera significativa en algunos casos (135, 380). Sin embargo, un estudio reciente ha reportado un incremento de los AaLT durante el proceso de maduración de la leche materna desde el calostro hasta los cuatro meses de lactancia (381), tal y como observamos en la cohorte estudiada.

Así mismo, el incremento significativo de la serina en el tercer mes de lactancia también ha sido descrito en un estudio mejicano del año 2001 (382), al igual que ocurre con la glutamina durante los primeros tres meses de lactancia, esta vez reportado en un estudio metabolómico de la leche materna de mujeres que viven en Inglaterra (344) y durante la maduración de la leche materna en otro estudio de EEUU en el cual se observa un aumento de las concentraciones de alanina, glutamato, glutamina, histidina y valina simultáneamente a la disminución de la isoleucina, lisina y taurina (383).

La evolución para el ácido glutámico siguió una tendencia a aumentar aunque no alcanzó la significancia estadística, mientras que el resto de aminoácidos individuales no experimentaron cambios durante los primeros tres meses de lactancia aunque se puede observar que el incremento significativo de los AaLT vendría promovido principalmente de los AaNE (Tabla 4.25, $p=0.017$).

De la comparación del perfil de aminoácidos (% de cada aminoácido respecto del total de aminoácidos libres cuantificados) con la revisión más reciente disponible para el perfil de aminoácidos en leche materna humana (384), observamos un mayor porcentaje de glutamina y metionina y menor de lisina y taurina. Respecto de estudios con poblaciones geográficamente cercanas (italiana y francesa) (136, 138), observamos que el contenido total de aminoácidos libres fue similar en ambos casos, encontrando niveles de triptófano, fenilalanina e isoleucina menores que los obtenidos en la cohorte estudiada respecto a los recientemente presentados por los autores franceses en 2013.

Por último evaluamos el ratio del triptófano frente al resto de aminoácidos neutros (tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina y valina) (Trp/AaLN), ya que éste se ha relacionado con la

ingesta de alimentos proteicos ricos en aminoácidos neutros en la comida cuya composición parece determinar las concentraciones de triptófano en el cerebro y por tanto de serotonina, lo que se ha asociado con el estado de ánimo y determinadas conductas alimentarias compulsivas (262).

En la cohorte estudiada resultó más alto ($\text{Trp/AaLN} = 0.21$) en comparación con el cálculo a partir de los datos en población francesa ($\text{Trp/AaLN} = 0.03$) (138), estadounidense ($\text{Trp/AaLN} = 0.03$) (383) y china ($\text{Trp/AaLN} = 0.05$) (135), lo cual podría estar relacionado a distintas fuentes proteicas de la dieta materna, ya que se han asociado ratios Trp/AaLN distintos según el tipo de proteína consumido con la dieta (gluten del trigo, proteína del maíz, proteína de la soja, caseína o alfa-lactoalbúmina) en ratas y para las proteínas lácteas también en humanos (262). En este sentido, se han analizado las potenciales correlaciones entre variables que resumen la dieta materna y dicho ratio y se comentan en el capítulo 4.4.1.

Efecto del IMC materno y sexo del lactante

Se identificaron diferencias asociadas al IMC materno para la glutamina, glicina, arginina, taurina, tirosina, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina, los AaSE, AaR, AaS y el ratio Trp/AaLN , durante los primeros tres meses de lactancia materna tal y como se indica en la Tabla 4.25. El sexo del lactante también mostró diferencias asociadas para la taurina y los AaS.

Al explorar los resultados para cada uno de los meses ensayados, observamos niveles de ácido aspártico inferiores en mujeres con sobrepeso u obesidad ($\text{IMC} \geq 25 \text{kg/m}^2$) en el primer mes de lactancia (Tabla 4.26, $p=0.021$), los de asparagina ($p=0.019$), glutamina ($p=0.023$) y taurina ($p=0.032$) en el segundo mes de lactancia (Tabla 4.27) y dicha observación se mantuvo en el tercero para la glutamina (Tabla 4.28, $p=0.014$).

En cuanto a la influencia de la obesidad, observamos un ratio Trp/AaLN más bajo el primer mes de lactancia ($p=0.015$) (Tabla 4.26), niveles inferiores de AaS el segundo mes (Tabla 4.26, $p=0.043$) y mayores de AaSE el tercer mes de lactancia (Tabla 4.28, $p=0.021$) en mujeres con $\text{IMC} \geq 25 \text{kg/m}^2$.

Por su parte, el sexo del lactante se asoció con diferencias significativas al primer mes de lactancia donde se identificaron niveles más bajos de alanina ($p=0.031$), taurina ($p=0.039$), leucina ($p=0.05$), lisina ($p=0.026$) y AaS ($p=0.02$) en niños en comparación con la leche de las madres que dieron de mamar a una niña. Los resultados para la taurina y AaS se mantuvieron significativamente diferentes entre sexos también al segundo mes de lactancia.

De entre todos los aminoácidos, existen algunos que han sido relacionados con distintas variables antropométricas, mecanismos de regulación del balance energético y de la saciedad como es el caso del ácido glutámico y la glutamina (134). Durante la lactancia, recientemente se ha descrito una correlación positiva entre el peso y la talla maternas y los niveles de ácido glutámico hacia el cuarto mes en leche materna de mujeres que viven en Dinamarca (134). Así mismo, se ha descrito una correlación negativa entre el IMC y el peso materno durante la lactancia y los niveles de glutamina en leche de transición (385).

Nuestros resultados también presentaron una correlación negativa entre el IMC materno promedio y los niveles de glutamina promedio de los tres meses de lactancia ensayados. Esta correlación también fue significativa para los niveles de serina. Contrariamente los niveles de tirosina y arginina se correlacionaron positivamente con el IMC materno (Figura 4.9).

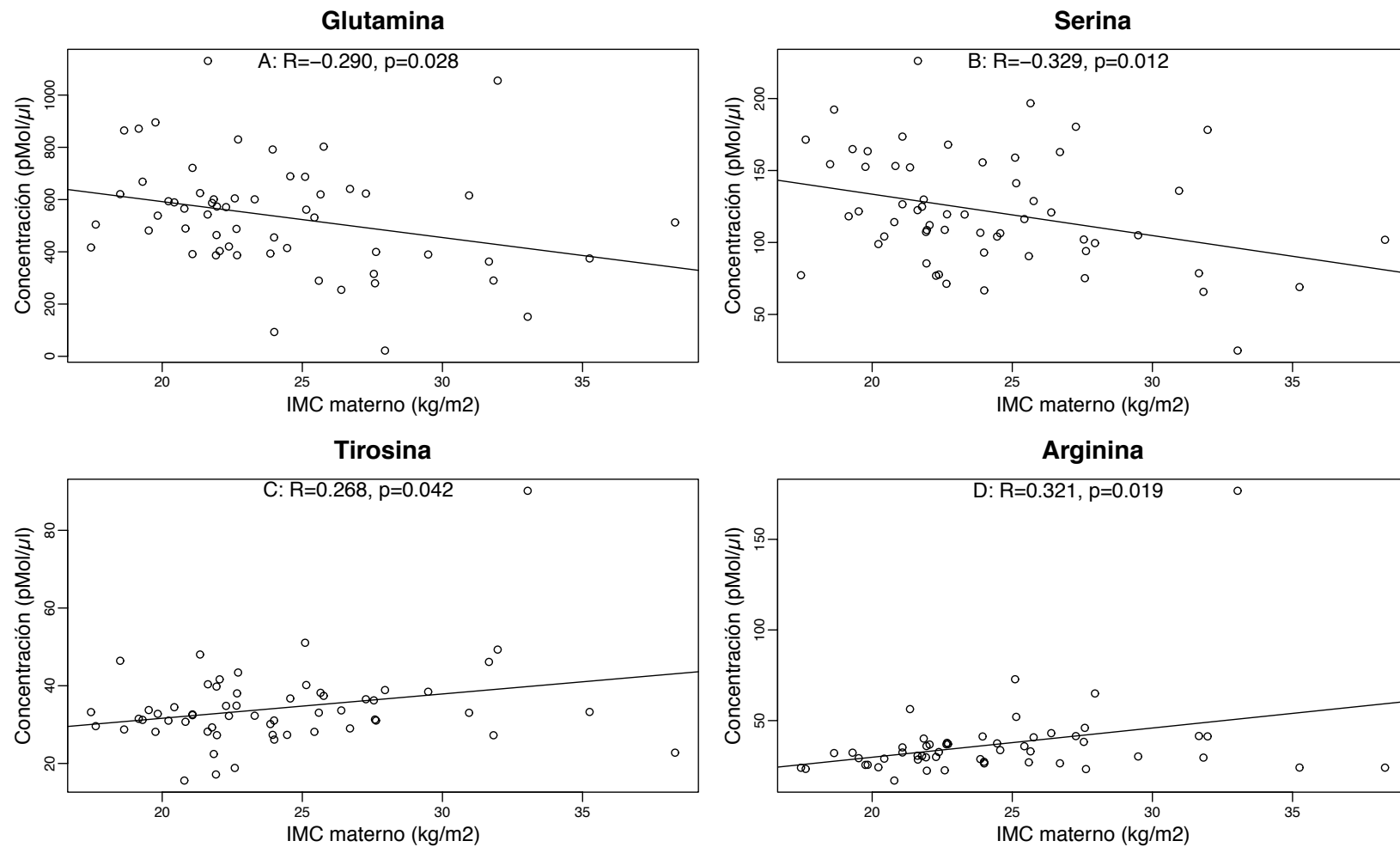


Figura 4.9 Correlaciones lineales entre la concentración de glutamina (A), serina (B), arginina (C) y tirosina (D) (promedio de los tres primeros meses de lactancia) y el IMC materno. R, coeficiente de correlación lineal de Pearson; p= nivel de significancia de la correlación lineal.

La tirosina es un Aa precursor de los neurotransmisores epinefrina, dopamina, noradrenalina y de las hormonas tiroideas; la arginina es precursora del óxido nítrico, estimula la secreción de insulina, hormona del crecimiento, prolactina, glucagón y progesterona y ambos aminoácidos son esenciales durante la lactancia (261). A éste último se le atribuyen funciones sobre la regulación del metabolismo, llegándose a plantear la arginina como un aminoácido con potencial en el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico al demostrar efectos sobre la proliferación, diferenciación y función del tejido adiposo marrón y también se ha visto que reduce la expresión de genes pro-inflamatorios en el tejido adiposo (137).

Las correlaciones observadas para las concentraciones de tirosina y arginina en leche materna con el IMC materno son por tanto un hallazgo a considerar en la propuesta de nuevos marcadores o circuitos que potencialmente podrían estar involucrados en la programación metabólica durante la lactancia y su relación con la obesidad.

El ratio Trp/AaLN fue inferior en leche de mujeres con sobrepeso u obesidad, lo que se traduce en un mayor contenido de los AaLN distintos del triptófano. Ello podría implicar una limitación de la entrada de triptófano para la síntesis de serotonina a nivel del sistema nervioso central y estar relacionado con la conducta alimentaria. En cualquier caso, esta aproximación tiene como objetivo plantear el ratio Trp/AaLN como una relación de interés en el contexto de la impronta metabólica durante la lactancia para el diseño de nuevos estudios.

La ganancia de peso corporal durante el embarazo se ha sugerido como un factor influyente sobre las concentraciones de ciertos AaL en leche materna (135). El análisis longitudinal de regresión mixto reveló un efecto de este factor sobre los niveles de ácido glutámico ($p=0.029$), glicina ($p=0.032$), alanina ($p=0.029$), AaLT ($p=0.028$), AaNE ($p=0.044$) y AaS ($p=0.046$) (Tabla 4.25). Sin embargo al explorar el sentido del efecto mediante correlaciones lineales, aunque la tendencia fue a asociar menores niveles de aminoácidos con una mayor ganancia de peso corporal durante el embarazo, en ningún caso se alcanzó la significancia estadística.

En relación a las observaciones asociadas al sexo del lactante, previamente se ha sugerido que los requerimientos de aminoácidos esenciales deben ser dependientes del sexo (386) y, de hecho, lactantes varones parecen requerir mayores niveles de proteínas y aminoácidos al tener un ritmo de fijación proteica más pronunciado durante los primeros meses de vida, para lo cual consumen un 10% más de leche que las niñas (342). En esta dirección, nuestros resultados, donde los varones recibieron una leche más pobre en taurina y AaS podrían estar reflejando un mecanismo compensatorio para mantener un aporte balanceado de los mismos, si asumimos que consumen más cantidad de leche.

PCA del perfil de aminoácidos

El análisis de componentes principales contribuyó a la evaluación de los perfiles de Aa y de su relevancia en leche materna. Se obtuvieron tres componentes principales que resumieron la varianza muestral en un 65.1% (Tabla 4.29).

Aminoácidos		PAa1	PAa2	PAa3
Ácido aspártico	ASP	-0.139	-0.224	0.176
Ácido glutámico	GLU	-0.127	-0.342	-0.056
Asparagina	ASN	-0.035	-0.362	0.095
Serina	SER	-0.031	-0.389	0.242
Glutamina	GLN	-0.014	-0.368	0.343
Histidina	HIS	-0.236	-0.148	0.020
Glicina	GLY	-0.199	-0.200	-0.239
Treonina	THR	-0.123	-0.369	0.024
Arginina	ARG	-0.306	0.170	-0.053
Alanina	ALA	-0.225	-0.151	-0.150
Taurina	TAU	-0.005	-0.240	-0.394
Tirosina	TYR	-0.335	0.059	-0.060
Cisteína	CYS	-0.115	-0.159	-0.605
Valina	VAL	-0.318	0.069	0.108
Metionina	MET	-0.220	0.068	-0.156
Triptófano	TRP	-0.206	0.033	0.234
Fenilalanina	PHE	-0.301	0.129	0.157
Isoleucina	ILE	-0.292	0.102	0.202
Leucina	LEU	-0.332	0.122	0.078
Lisina	LYS	-0.324	0.167	-0.099
Varianza acumulada explicada (%)		36.6	57.7	65.1
IMC materno	IMC<25	0.504	-0.313	
	IMC≥25	-0.888	0.552	
	p-valor	0.135	0.127	

Tabla 4.29 Matriz de coeficientes de correlación y porcentajes de la varianza explicada por cada componente extraído del análisis de componentes principales (PCA) del perfil de aminoácidos (Aa) en

leche materna. Se incluyen las puntuaciones promedio de adherencia a cada uno de los componentes y las diferencias existentes debidas a los factores de interés del estudio (IMC materno y sexo del lactante).

El primer componente (PAa1) se caracterizó por bajos niveles de los AaE valina, leucina, isoleucina, lisina y fenilalanina que incluyen los AaR y los semi-esenciales arginina y tirosina. Este primer componente explicó un 36.6% de la varianza muestral y presentó una adherencia diferencial (en sentidos opuestos) entre grupos por IMC materno, aunque ésta no resultó significativa (Tabla 4.29, $p=0.135$). La tendencia sugiere un perfil más pobre de los Aa que forman este primer componente en mujeres con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$.

El segundo componente (PAa2) se caracterizó por bajos niveles de ácido glutámico, glutamina, serina, asparagina y treonina y explicó un 21.1% adicional de la varianza muestral. Este componente también presentó una tendencia diferencial entre los grupos asociada al IMC materno, sin alcanzar la significancia (Tabla 4.29, $p=0.127$). La tendencia sugiere un perfil más rico de los Aa que forman este segundo componente en mujeres con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$.

Finalmente, el tercer componente supuso un 7.4% de la varianza explicada y se caracterizó por niveles bajos de aminoácidos azufrados taurina y cisteína, junto con niveles altos de glutamina. No se encontraron diferencias asociadas a ninguno de los factores de interés evaluados.

Del análisis mediante modelos lineales entre variables antropométricas y las puntuaciones de adherencia a los componentes extraídos se observó una relación lineal positiva significativa entre la adherencia al PAa2 pobre en ácido glutámico, glutamina, serina, asparagina y treonina con el IMC materno ($R=0.292$, $p=0.027$). Así, las mujeres con IMC más altos presentaron una composición de su leche materna más pobre en los aminoácidos mencionados.

Este efecto también resultó significativo para el peso materno al mes de lactancia (P1M) ($R=0.272$, $p=0.039$) y se observó la misma tendencia en relación al peso antes del embarazo (PAE) ($R=0.243$, $p=0.067$). Además, este mismo componente presentó una tendencia en su relación lineal con la velocidad de crecimiento de la descendencia de 0 a 6 meses ($R=0.221$, $p=0.095$).

Estudio de correlaciones del perfil de aminoácidos en leche materna frente a variables antropométricas maternas y del crecimiento de la descendencia

Tras el análisis del perfil de Aa según los factores de interés, llevamos a cabo un estudio de correlaciones múltiples para determinar las asociaciones existentes entre las concentraciones de

Aa y otras variables antropométricas maternas y del crecimiento infantil. Así, dibujamos un correlograma para el promedio de las tres determinaciones (Figura 4.10).

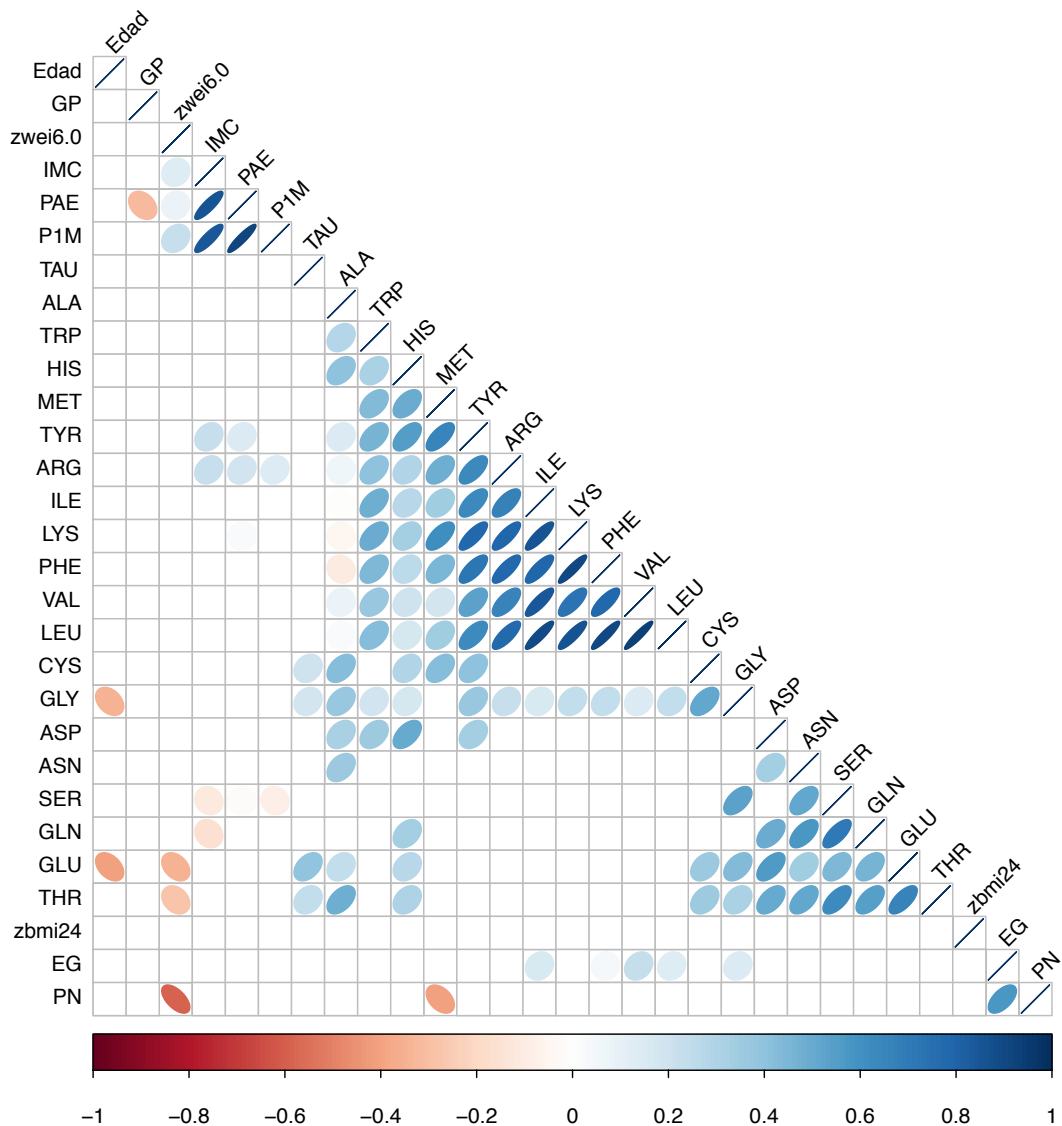


Figura 4.10 Correlograma del perfil de aminoácidos (Aa) individuales (promedio de los tres primeros meses de lactancia) y variables antropométricas maternas y de la descendencia. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$, quedando en blanco aquellas correlaciones no significativas estadísticamente. Las correlaciones positivas en azul y las negativas en rojo. La intensidad de los colores responde a la intensidad de la correlación de Pearson. El orden de las variables responde a una agrupación jerárquica de clusters. TAU, taurina; ALA, alanina; TRP, triptófano; HIS, histidina; MET, metionina; TYR, tirosina; ARG, arginina; ILE, isoleucina; LYS, lisina; PHE, fenilalanina; VAL, valina; LEU, leucina; CYS, cisteína; GLY, glicina; ASP, ácido aspártico; ASN, asparragina; SER, serina; GLN, glutamina; GLU, ácido glutámico; THR, treonina. PAE, peso antes del embarazo; P1M, peso materno al mes de lactancia; IMC, índice de masa corporal materno promedio; GP, ganancia de peso durante el embarazo; EG, edad gestacional; PN, peso al nacer de la descendencia; zbmi24, z-scores para el IMC para la edad a los 24 meses; zwei6.0, velocidad de ganancia de peso entre el nacimiento y los 6 meses.

Las correlaciones entre los aminoácidos fueron positivas en todos los casos y se observaron agrupaciones entre sí que responden al análisis jerárquico de clusters. Así, se destaca la agrupación por un lado de aminoácidos no esenciales (glicina, ácido aspártico, asparagina, serina, glutamina y ácido glutámico) y treonina y por otro lado la agrupación que presentaron los esenciales (triptófano, histidina, metionina, isoleucina, lisina, fenilalanina, valina, leucina) con los semi-esenciales (cisteína, tirosina y arginina) y la glicina.

En relación a las variables antropométricas maternas observamos una correlación positiva entre el IMC, peso antes del embarazo (PAE) y peso al mes tras el parto (P1M) frente a las concentraciones de tirosina y arginina en leche materna y negativa con la serina y la glutamina.

En relación a las variables antropométricas de la descendencia observamos una correlación negativa entre las concentraciones de metionina y el peso al nacer de la descendencia ($R=-0.409$, $p=0.035$), así como entre las concentraciones de ácido glutámico ($R=-0.348$, $p=0.000$) y treonina ($R=-0.272$, $p=0.000$) con la velocidad de crecimiento de 0 a 6 meses (zwei6.0).

En cuanto a otras variables cuantitativas evaluadas, observamos una correlación negativa entre la edad materna y las concentraciones de glicina ($R=-0.346$, $p=0.022$) y ácido glutámico ($R=-0.406$, $p=0.023$) y positivas entre la edad gestacional y las concentraciones de isoleucina ($R=0.164$, $p=0.012$), valina ($R=0.237$, $p=0.015$), leucina ($R=0.139$, $p=0.006$) y glicina ($R=0.156$, $p=0.032$).

La correlación entre la edad materna con las concentraciones de glicina y ácido glutámico, no tienen precedentes en la bibliografía disponible (381) y su interpretación requiere de más estudios.

En cuanto al ácido glutámico, se observó una correlación negativa con la edad materna y la velocidad de crecimiento infantil durante los primeros seis meses de vida. El ácido glutámico junto con la glutamina y la taurina suponen aproximadamente el 50% del total de AaL en leche humana. En comparación con su predominancia en leches de fórmula, alrededor del 10% o inferior, se ha sugerido que estos aminoácidos contribuyen en las diferencias observadas frente a la protección de la mucosa y el aporte de nitrógeno y neurotransmisores al lactante en comparación con los bebés alimentados a base de fórmulas (136), lo que podría subyacer a las diferencias observadas en la predisposición a la obesidad diferente entre lactancia exclusiva y artificial.

El ácido glutámico es precursor del ácido gamma-aminobutírico (GABA), neurotransmisor inhibitor más abundante en el cerebro al que se le han atribuido importantes funciones de

regulación del circuito de saciedad en adultos (139, 261, 387). De hecho, leches artificiales suplementadas con ácido glutámico se han asociado con tomas más cortas y una ingesta energética inferior (139), lo cual le confiere un cierto poder saciante también durante la lactancia (388). Cabe destacar los resultados de estudios recientes, que establecen las vías de señalización del ácido glutámico entre las más determinantes del índice de masa corporal (389).

Interesantemente, nuestros resultados indican una relación entre las concentraciones de ácido glutámico en leche materna con una menor ganancia de peso corporal en la descendencia durante los primeros seis meses de vida, resultados que estarían en concordancia con un potencial efecto saciante.

Estudio longitudinal de la influencia de variables de confusión

Los efectos de las variables de confusión sobre el perfil de Aa en la leche materna de la población estudiada se presentan en la Tabla 4.25.

Observamos que el consumo de suplementos nutricionales, la estación en la que tuvo lugar el parto y el tipo de lactancia tan solo presentaron diferencias entre grupos para la tirosina ($p=0.043$), la metionina ($p=0.047$) y la fenilalanina ($p=0.028$) respectivamente, mientras que la edad gestacional, el tipo de parto y el ser o no primípara influyeron sobre un gran número de Aa.

Recientemente se ha descrito que el tipo de lactancia (exclusiva o mixta) no modifica el perfil de Aa en leche materna (134). Nuestros resultados muestran este mismo patrón a excepción del efecto sobre la fenilalanina, con mayores niveles en lactancias mixtas. En relación a la toma de suplementos y la estación del parto, no se dispone hasta la fecha de ninguna referencia en la literatura para poder comparar los resultados obtenidos.

El tipo de parto (natural o cesárea) tuvo un efecto significativo sobre los niveles de ácido glutámico ($p=0.001$), serina ($p=0.005$), glutamina ($p=0.008$), treonina ($p=0.001$), taurina ($p=0.019$), así como el total de aminoácidos determinados ($p<0.001$), los AaNE ($p<0.001$) y los AaS ($p=0.020$), de forma que en todos los casos éstos fueron inferiores cuando el parto fue por cesárea.

Ser o no primípara se asoció con distintos niveles en leche materna para el ácido glutámico ($p=0.001$), glicina ($p=0.024$), treonina ($p=0.021$), taurina ($p=0.012$), cisteína ($p=0.049$), así como el total de aminoácidos ($p=0.001$), AaSE ($p=0.033$), AaNE ($p=0.001$), AaS ($p=0.005$) y el ratio Trp/AaLN ($p=0.039$). En este caso el haber tenido partos previos se asoció con mayores niveles de los aminoácidos descritos y un ratio Trp/AaLN menor.

Hasta aquí estas dos variables que mostraron una influencia importante sobre el perfil de Aa en leche materna no conocen precedentes en la literatura científica que nosotros sepamos.

Finalmente observamos un efecto de la edad gestacional sobre varios Aa, tales como la glicina ($p=0.010$), arginina ($p=0.034$), alanina ($p=0.043$), valina ($p=0.003$), triptófano ($p=0.020$), fenilalanina ($p=0.000$), isoleucina ($p=0.011$), leucina ($p=0.001$) y lisina ($p=0.036$), es decir, principalmente sobre los esenciales ($p=0.002$) y los ramificados ($p=0.001$).

Al tratar la variable edad gestacional desde la clasificación de los nacimientos en pre-, post- o a término, los resultados fueron prácticamente idénticos. La direccionalidad de los efectos fue en todos los casos una correlación positiva entre la edad gestacional y los niveles de los Aa descritos, de forma que a mayor duración de la gestación las concentraciones en leche materna resultaron mayores.

Los niveles de AaR en leche materna proceden de una captación especialmente activa por parte de la glándula mamaria durante la lactancia (390). Su presencia parece estar estrechamente regulada para evitar dosis demasiado bajas o demasiado altas que se han identificado como posibles influyentes sobre el crecimiento y desarrollo cerebral, el metabolismo de los carbohidratos, la ganancia de peso y la predisposición a la diabetes (386).

Nuestros resultados muestran una correlación positiva de estos AaR con la edad gestacional, lo cual podría responder a una regulación *a posteriori* del parto para asegurar unos niveles determinados en función de la edad gestacional del recién nacido o simplemente una manifestación de la función anabólica sobre la síntesis proteica intracelular que estos Aa tienen durante el embarazo, mediados por la glutamina y que contribuyen al crecimiento fetal (137).

Las concentraciones de AaR resultaron ser mayores en madres con sobrepeso u obesidad (Tabla 4.25), y la obesidad materna suele alargar la edad gestacional (391), por lo que mayores niveles de AaR, tal y como ocurre también en leches de fórmula, podrían determinar crecimientos más pronunciados en la población infantil tal y como ya ha sido previamente sugerido por Brands *et al.* (9, 41).

Como se ha podido identificar, la edad gestacional resultó un factor de gran importancia sobre la concentración de Aa de la leche materna. Los resultados obtenidos son opuestos a los reportados por otros autores, según los cuales, a menor edad gestacional o en nacimientos pre-término, los niveles de Aa son mayores, sin embargo, esta observación se hizo en calostro y leche de transición, mientras que una vez la leche es madura, no se obtuvieron diferencias significativas entre grupos pre- vs. a término (135, 383, 384).

4.3.3 Evolución de la concentración de minerales

Las concentraciones promedio para los minerales estudiados a lo largo de los tres primeros meses de lactancia fueron de 44.8 ± 41.3 mg/dL de calcio, 16.8 ± 7.8 mg/dL de fósforo, 16.7 ± 9.1 mg/dL de sodio, 52.7 ± 24.9 mg/dL de potasio, 3.9 ± 1.3 mg/dL de magnesio, y 16.6 ± 13.1 mg/dL de azufre (Tabla 4.30).

(mg/dL)		N=160	N=52	N=54	N=54	Tiempo	IMC	Sexo	IMCxSexo	EN	EG	Pre-/término	TEG	TL	Ser o no primípara
CAL	Calcio	44.8 (41.3)	44.9 (28.9)	46.1 (43.5)	43.5 (49.3)	0.947	0.460	0.313	0.045	0.000					
FOS	Fósforo	16.8 (7.84)	20.9 (8.21)	15.9 (7.84)	13.9 (5.68)	0.000	0.318	0.199	0.155			0.023			
SOD	Sodio	16.7 (9.13)	20.4 (8.46)	16.3 (9.79)	13.5 (7.83)	0.000	0.040	0.423	0.321		0.042		0.044		
POT	Potasio	52.7 (24.9)	67.7 (29.6)	47.4 (24.0)	43.7 (10.7)	0.000	0.184	0.687	0.687			0.000			
MAG	Magnesio	3.86 (1.30)	4.06 (1.46)	3.75 (1.37)	3.78 (1.03)	0.416	0.102	0.627	0.097			0.015			
AZU	Azufre	16.6 (13.1)	19.9 (15.6)	16.1 (13.5)	13.8 (8.93)	0.038	0.995	0.121	0.980					0.000	
Ca/P	Ratio calcio/fósforo	3.22 (3.46)	2.49 (1.96)	3.56 (3.42)	3.57 (4.45)	0.176	0.776	0.349	0.001	0.024			0.000		
Na/K	Ratio sodio/potasio	0.34 (0.17)	0.35 (0.17)	0.35 (0.16)	0.32 (0.19)	0.609	0.411	0.393	0.512				0.001		0.007

Tabla 4.30 Concentración de minerales (mg/dL) determinados por espectrometría de emisión óptica y ratios relevantes en leche materna durante los primeros tres meses consecutivos tras el parto. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar. CAL, calcio; FOS, fósforo; SOD, sodio; POT, potasio; MAG, magnesio; AZU, azufre; Ca/P, ratio entre el calcio y el fósforo; Na/K, ratio entre el sodio y el potasio. El análisis estadístico principal responde a ANOVA de medidas repetidas. Se incluye el análisis por modelo lineal mixto para la evaluación longitudinal del efecto de los factores de interés (IMC materno y sexo del lactante), así como los efectos de los factores de confusión (estación del parto (EP), edad gestacional (EG), nacimientos pre-/post- o a término, tamaño para la edad gestacional (TEG), tipo de lactancia (TL) y ser o no primípara). El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$. No se muestran los resultados que no alcanzaron la significancia estadística.

Estos resultados entran en el rango descrito en leche materna en bibliografía relacionada, a excepción de los niveles de calcio, para los cuales obtuvimos un resultado significativamente superior (94, 338, 345, 357, 392). Asimismo, se calculó la relación entre los niveles de calcio respecto del fósforo (Ca/P, 3.2 ± 3.5) y del sodio frente al potasio (Na/K, 0.34 ± 0.17).

El estudio de la evolución de la composición mineral mostró una disminución significativa para los niveles de fósforo ($p=0.000$), sodio ($p=0.000$), potasio ($p=0.000$) y azufre ($p=0.038$) entre el primer y el tercer mes de lactancia; mientras que el calcio y el magnesio se mantuvieron constantes. Estos resultados coinciden con datos publicados sobre los cambios en las concentraciones de minerales según la etapa de lactancia aunque hay ciertas discrepancias entre los distintos estudios (94, 357, 363).

El ratio Ca/P en leche humana es de 1.8 a 2.4 según algunos autores (94, 357); la EFSA considera unos valores de ingesta relativa entre 0.9 y 1.7 como seguros durante la infancia (de 0 a 36 meses de edad) para evitar desajustes en el metabolismo del calcio (392). En el presente estudio, el promedio muestral resultó en valores superiores, debido a las mayores concentraciones de calcio registradas y a la disminución progresiva durante los tres meses de estudio de los niveles de fósforo.

Recientemente se han descrito ratios Ca/P en leche materna entre 4.5 y 5.5, particularmente asociados a bajos niveles de fósforo, sin encontrar signos de osteopenia (363). De hecho, un balance positivo del calcio sobre el fósforo podría implicar un mayor potencial para la formación ósea, contrariamente a un ratio inferior debido a mayores niveles de fósforo dietético que favorece la pérdida de masa ósea (392). Por tanto, los valores de calcio observados y el ratio Ca/P en la cohorte estudiada son adecuados para la etapa de lactancia e incluso podemos considerarlos beneficiosos desde el punto de vista del metabolismo osteocálcico.

El ratio Na/K por su parte se mantuvo constante al experimentar ambos minerales una reducción simultánea de sus concentraciones en el periodo evaluado y fue similar o inferior al calculado a partir de los datos de otros autores (94, 141, 345, 392). Un ratio Na/K más bajo, se considera fisiológicamente beneficioso debido al efecto antihipertensivo que supone un balance positivo del potasio sobre el sodio (306).

Efecto del IMC materno y sexo del lactante

Se observaron diferencias asociadas al IMC materno para el sodio independientemente del sexo del lactante ($p=0.040$) en el análisis longitudinal (Tabla 4.30), que no vino respaldado con diferencias significativas para cada uno de los meses puntuales, aunque sí se puede observar una tendencia de que las madres con $IMC\geq 25\text{kg/m}^2$ presentaron niveles superiores de sodio en leche en el primer y el tercer mes, en comparación con las madres normopeso (Tablas 4.31-33).

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(mg/dL)		N=52	N=34	N=18		N=29	N=23		N=21	N=8	N=13	N=10	
CAL	Calcio	44.9 (28.9)	43.5 (30.5)	47.6 (26.1)	0.615	42.8 (25.0)	47.5 (33.5)	0.579	36.7 (20.0)	58.9 (30.9)	54.4 (41.0)	38.6 (18.6)	0.027
FOS	Fósforo	20.9 (8.21)	19.8 (8.61)	22.9 (7.19)	0.181	20.8 (7.68)	21.1 (9.00)	0.898	20.4 (7.95)	21.7 (7.37)	18.9 (9.84)	23.9 (7.29)	0.445
SOD	Sodio	20.4 (8.46)	18.6 (6.39)	23.6 (10.9)	0.087	21.5 (8.71)	19.0 (8.11)	0.287	18.7 (5.49)	28.7 (11.6)	18.5 (7.87)	19.5 (8.81)	0.060
POT	Potasio	67.7 (29.6)	64.5 (29.8)	73.8 (29.1)	0.284	69.8 (30.6)	65.0 (28.8)	0.567	63.6 (28.8)	86.2 (30.6)	66.0 (32.4)	63.8 (24.9)	0.160
MAG	Magnesio	4.06 (1.46)	3.89 (1.49)	4.37 (1.38)	0.261	4.11 (1.38)	3.99 (1.58)	0.793	3.75 (1.34)	5.04 (1.03)	4.13 (1.74)	3.82 (1.42)	0.063
AZU	Azufre	19.9 (15.6)	19.7 (18.8)	20.3 (6.66)	0.876	22.3 (19.8)	17.0 (7.25)	0.196	21.5 (23.2)	24.2 (4.39)	16.9 (7.93)	17.2 (6.69)	0.806
Ca/P	Ratio calcio/fósforo	2.49 (1.96)	2.64 (2.28)	2.21 (1.16)	0.366	2.23 (1.26)	2.82 (2.59)	0.328	2.01 (1.18)	2.81 (1.37)	3.66 (3.19)	1.72 (0.70)	0.017
Na/K	Ratio sodio/potasio	0.35 (0.17)	0.34 (0.16)	0.36 (0.18)	0.775	0.36 (0.19)	0.32 (0.13)	0.370	0.36 (0.19)	0.38 (0.21)	0.31 (0.11)	0.34 (0.16)	0.986

Tabla 4.31 Concentración de minerales (mg/dL) y ratios relevantes en leche materna al primer mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. CAL, calcio; FOS, fósforo; SOD, sodio; POT, potasio; MAG, magnesio; AZU, azufre; CaP, ratio entre el calcio y el fósforo; NaK, ratio entre el sodio y el potasio. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. Cuando fue necesario se aplicó análisis post-hoc de Tukey y si se obtuvieron diferencias inter-grupales, éstas se señalaron mediante letras como superíndices. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(mg/dL)		N=54	N=36	N=18		N=29	N=25		N=22	N=7	N=14	N=11	
CAL	Calcio	46.1 (43.5)	43.8 (39.1)	50.7 (52.0)	0.625	40.0 (39.8)	53.2 (47.1)	0.276	35.6 (23.4)	53.9 (72.0)	56.8 (54.2)	48.7 (38.5)	0.313
FOS	Fósforo	15.9 (7.84)	15.7 (6.65)	16.2 (10.0)	0.872	14.9 (4.36)	17.0 (10.5)	0.369	15.2 (4.51)	14.2 (4.13)	16.7 (9.20)	17.4 (12.5)	0.733
SOD	Sodio	16.3 (9.79)	16.4 (8.40)	16.1 (12.4)	0.944	16.1 (9.37)	16.4 (10.5)	0.913	16.8 (10.4)	14.0 (4.64)	15.6 (3.63)	17.5 (15.6)	0.438
POT	Potasio	47.4 (24.0)	45.5 (10.9)	51.2 (39.0)	0.550	47.1 (10.4)	47.7 (33.8)	0.925	46.8 (10.9)	47.9 (9.34)	43.4 (11.1)	53.3 (50.2)	0.548
MAG	Magnesio	3.75 (1.37)	3.65 (1.00)	3.94 (1.94)	0.560	3.60 (1.00)	3.93 (1.71)	0.398	3.54 (1.04)	3.78 (0.91)	3.84 (0.94)	4.05 (2.42)	0.976
AZU	Azufre	16.1 (13.5)	16.0 (14.5)	16.2 (11.9)	0.963	17.0 (15.5)	15.0 (11.1)	0.582	17.0 (17.1)	16.9 (9.84)	14.4 (9.26)	15.7 (13.5)	0.853
Ca/P	Ratio calcio/fósforo	3.56 (3.42)	3.63 (3.69)	3.41 (2.89)	0.806	2.95 (2.55)	4.26 (4.16)	0.176	2.74 (2.10)	3.60 (3.77)	5.04 (5.11)	3.28 (2.37)	0.197
Na/K	Ratio sodio/potasio	0.35 (0.16)	0.37 (0.17)	0.32 (0.11)	0.228	0.35 (0.19)	0.35 (0.10)	0.885	0.36 (0.21)	0.30 (0.09)	0.37 (0.09)	0.33 (0.12)	0.758

Tabla 4.32 Concentración de minerales (mg/dL) y ratios relevantes en leche materna al segundo mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. CAL, calcio; FOS, fósforo; SOD, sodio; POT, potasio; MAG, magnesio; AZU, azufre; CaP, ratio entre el calcio y el fósforo; NaK, ratio entre el sodio y el potasio. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la t de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. Cuando fue necesario se aplicó análisis post-hoc de Tukey y si se obtuvieron diferencias inter-grupales, éstas se señalaron mediante letras como superíndices. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

		Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(mg/dL)		N=54	N=35	N=19		N=28	N=26		N=20	N=8	N=15	N=11	
CAL	Calcio	43.5 (49.3)	41.9 (44.9)	46.4 (57.7)	0.773	42.5 (52.2)	44.6 (47.0)	0.878	38.2 (43.9)	53.1 (71.3)	46.9 (47.3)	41.4 (48.7)	0.487
FOS	Fósforo	13.9 (5.68)	13.8 (5.86)	14.0 (5.47)	0.885	12.9 (5.35)	15.0 (5.93)	0.178	13.7 (5.35)	10.8 (5.05)	13.9 (6.68)	16.4 (4.61)	0.098
SOD	Sodio	13.5 (7.83)	12.0 (4.45)	16.2 (11.4)	0.137	14.0 (8.95)	12.9 (6.52)	0.598	12.2 (5.15)	18.7 (14.3)	11.8 (3.46)	14.5 (9.22)	0.395
POT	Potasio	43.7 (10.7)	43.6 (8.48)	43.9 (14.2)	0.932	43.8 (9.69)	43.5 (11.9)	0.911	44.8 (10.2)	41.5 (8.51)	42.0 (5.44)	45.6 (17.5)	0.274
MAG	Magnesio	3.78 (1.03)	3.68 (0.90)	3.98 (1.24)	0.36	3.74 (0.97)	3.83 (1.11)	0.751	3.58 (0.96)	4.14 (0.95)	3.81 (0.84)	3.86 (1.44)	0.402
AZU	Azufre	13.8 (8.93)	14.1 (10.4)	13.3 (5.39)	0.737	14.9 (11.6)	12.6 (4.70)	0.342	15.2 (13.5)	14.2 (4.76)	12.5 (3.74)	12.7 (5.96)	0.818
Ca/P	Ratio calcio/fósforo	3.57 (4.45)	3.18 (2.57)	4.30 (6.70)	0.49	3.77 (5.43)	3.36 (3.17)	0.736	2.53 (1.62)	6.86 (9.56)	4.04 (3.33)	2.44 (2.82)	0.021
Na/K	Ratio sodio/potasio	0.32 (0.19)	0.28 (0.10)	0.38 (0.27)	0.132	0.33 (0.22)	0.30 (0.14)	0.51	0.28 (0.12)	0.46 (0.35)	0.28 (0.08)	0.33 (0.20)	0.195

Tabla 4.33 Concentración de minerales (mg/dL) y ratios relevantes en leche materna al tercer mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. CAL, calcio; FOS, fósforo; SOD, sodio; POT, potasio; MAG, magnesio; AZU, azufre; CaP, ratio entre el calcio y el fósforo; NaK, ratio entre el sodio y el potasio. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. Cuando fue necesario se aplicó análisis post-hoc de Tukey y si se obtuvieron diferencias inter-grupales, éstas se señalaron mediante letras como superíndices. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

La ingesta de sodio por parte de las madres siguió esta misma tendencia, con mayores ingestas de este mineral en mujeres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (Tabla 4.11), lo cual sugiere una potencial relación entre la ingesta de este mineral y su presencia en leche materna, aunque no obtuvimos confirmación para esta correlación (ver capítulo 4.4.1).

La ingesta adecuada de sodio de 0 a 6 meses de edad se ha establecido en 15mg/dL (392), por lo que durante los primeros dos meses de lactancia, la población infantil estudiada ingirió, en promedio, cantidades ligeramente por encima de dicha estimación, en especial aquellos que recibieron lactancia mixta, ya que los niveles de sodio en leches de fórmula es alrededor de cuatro veces superior a la materna (393). En algunos estudios las concentraciones de sodio registradas en calostro (33 a 275mg/dL) superan también las ingestas adecuadas (394, 395), por lo que los resultados obtenidos suponen una ingesta estimada adecuada para los lactantes.

Aun así, cabe mencionar que la concentración de sodio en leche materna se ha relacionado con la inhibición de la lactogénesis (394) y la ingesta de sal en madres lactantes con el cese de la lactancia materna (310); así pues, niveles de sodio más elevados en leche de mujeres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$, junto con ingestas más elevadas de sodio podrían influir en la mayor preponderancia de lactancia mixta observada en este grupo de mujeres (Tabla 4.1).

Por su parte, las concentraciones de calcio ($p=0.045$) y el ratio Ca/P ($p=0.001$) mostraron un efecto interacción entre el IMC materno y el sexo del lactante. Concretamente, las concentraciones de calcio en leche de mujeres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ fue superior al de las mujeres normopeso entre las que tuvieron una niña y a la inversa entre las que tuvieron un niño. El ratio Ca/P siguió el mismo patrón descrito (Tabla 4.30).

Este efecto longitudinal se hizo específicamente significativo en el primer mes de lactancia tanto para el calcio ($p=0.027$) como para el ratio Ca/P ($p=0.017$) y para éste último parámetro, también en el tercer mes de lactancia ($p=0.021$) (Tablas 4.31-33). El desarrollo y argumentación de estas observaciones se encuentran en el apartado “Estudio longitudinal de la influencia de variables de confusión” al final de este capítulo.

Estudio de correlaciones entre los niveles de minerales en leche materna frente a variables antropométricas maternas y del crecimiento de la descendencia

Tras la evaluación de las diferencias grupales asociadas al IMC materno y el sexo del lactante llevamos a cabo un estudio de las correlaciones entre los distintos minerales y variables antropométricas de la población de estudio. La matriz de correlaciones se presenta en forma de correlograma para el promedio de las tres determinaciones de los minerales en leche materna (Figura 4.11).

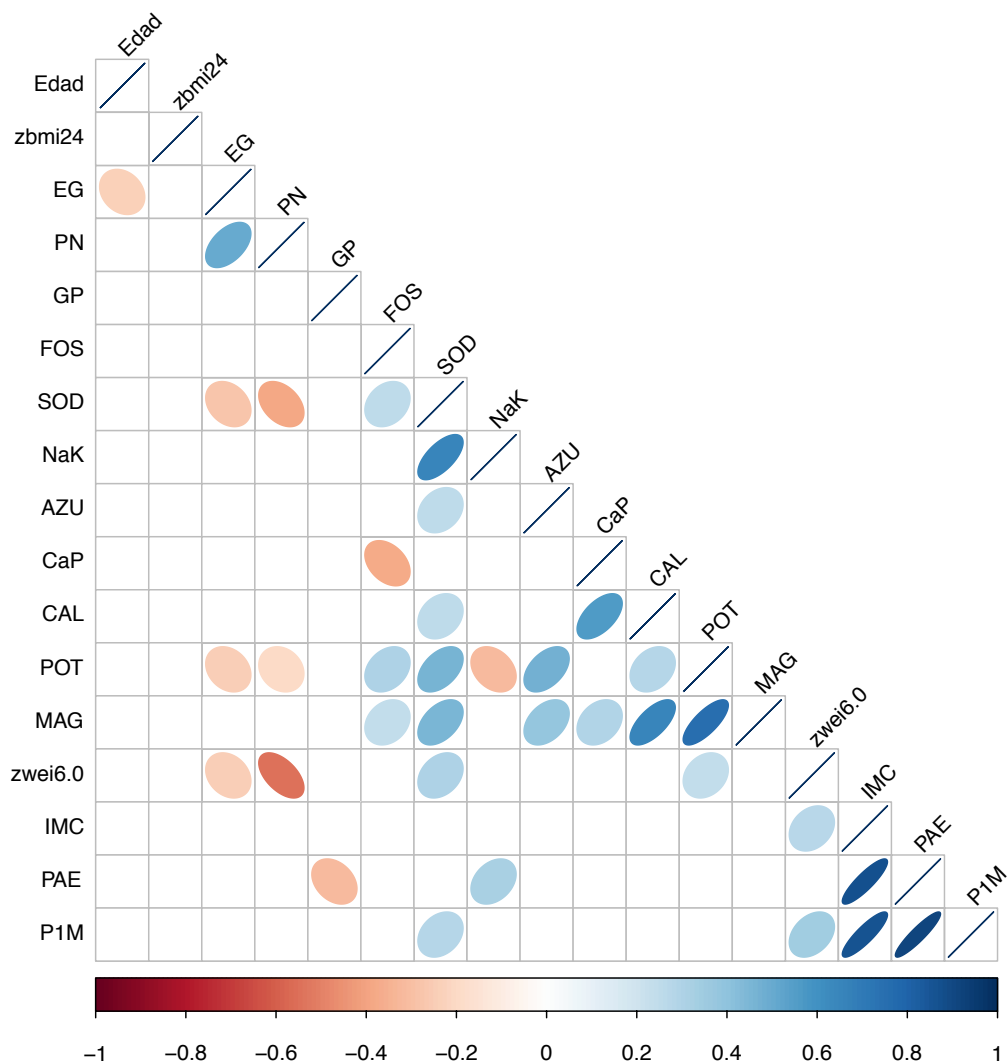


Figura 4.11 Correlograma de las concentraciones de minerales (promedio de los tres primeros meses de lactancia) y variables antropométricas maternas y de la descendencia. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$, quedando en blanco aquellas correlaciones no significativas estadísticamente. Las correlaciones positivas en azul y las negativas en rojo. La intensidad de los colores responde a la intensidad de la correlación de Pearson. El orden de las variables responde a una agrupación jerárquica de clusters. CAL, calcio; FOS, fósforo; SOD, sodio; POT, potasio; MAG, magnesio; AZU, azufre; CaP, ratio entre el calcio y el fósforo; NaK, ratio entre el sodio y el potasio. PAE, peso antes del embarazo; P1M, peso materno al mes de lactancia; IMC, índice de masa corporal materno promedio; GP, ganancia de peso durante el embarazo; EG, edad gestacional; PN, peso al nacer de la descendencia; zBMI24, z-scores para el IMC para la edad a los 24 meses; zwei6.0, velocidad de ganancia de peso entre el nacimiento y los 6 meses.

Se observaron correlaciones positivas entre los minerales, lo cual indica una regulación más o menos concertada de la secreción de los diferentes minerales estudiados en leche.

A continuación, se observaron correlaciones positivas entre el peso antes del embarazo (PAE) y el ratio Na/K de la leche materna ($R=0.323$, $p=0.022$), así como entre el peso materno al mes de lactancia y los niveles de sodio ($R=0.282$, $p=0.047$).

Por otro lado, a mayor edad gestacional (EG) mayor fue el peso al nacer (PN) de la descendencia ($R=0.504$, $p<0.001$). Además encontramos una correlación negativa entre la EG y PN de la descendencia frente a los niveles de sodio (EG; $R=-0.276$, $p=0.033$ y PN; $R=-0.386$, $p=0.001$) y potasio (EG; $R=-0.245$, $p=0.039$ y PN; $R=-0.191$, $p=0.046$) pero positiva frente a la velocidad en la ganancia de peso de 0 a 6 meses de los lactantes (Na; $R=0.302$, $p=0.018$ y K, $R=0.246$, $p=0.029$).

Este dibujo relaciona una edad gestacional mayor con un mayor peso al nacer de la descendencia, lo que a su vez supone menores concentraciones de sodio y potasio en leche materna seguido de una velocidad de crecimiento de la descendencia más pronunciada durante los primeros seis meses de vida.

Se trata pues de una posible vía de mediación para las concentraciones de sodio y potasio en leche materna de la transmisión intergeneracional del efecto que tiene el peso materno sobre la edad gestacional, el peso al nacer y la velocidad de la ganancia del peso de 0 a 6 meses en la descendencia, hasta la fecha no reportada y que será evaluada mediante análisis estadísticos complejos en el capítulo 4.4.3.1.

Estudio longitudinal de la influencia de variables de confusión

Se observaron efectos de la estación en la que tuvo lugar el parto, la edad gestacional, nacimientos pre-/a término, tamaño para la edad gestacional, el tipo de lactancia y el ser o no primípara sobre las concentraciones de minerales en leche materna (Tabla 4.30). Se identificó la edad gestacional como un factor influyente sobre las concentraciones de sodio ($p=0.042$), potasio ($p=0.000$), magnesio ($p=0.015$) y fósforo ($p=0.023$) de manera que a menor edad gestacional o en nacimientos pre-término se detectaron concentraciones más altas de estos minerales, aunque el análisis por meses puntuales no reveló diferencias significativas a excepción de las concentraciones de sodio al tercer mes de lactancia en base a la edad gestacional ($R=0.111$, $p=0.014$).

Recientemente no se han identificado diferencias a lo largo del primer mes y medio de lactancia entre nacimientos pre-término y a término ni correlaciones entre las concentraciones de calcio y fósforo frente a la edad gestacional (338, 363), sin embargo, si se ha observado una tendencia a presentar mayores niveles de potasio y fósforo en lactantes extremadamente pre-término (<28

semanas) (345) y se han identificado mayores concentraciones de sodio en nacimientos pre-término durante lactancias mixtas (396) y en leche de transición (397). Estas particularidades tienen especial interés en la formulación más adaptada de las leches artificiales según la edad gestacional del lactante.

El sodio en leche materna también se ha relacionado con la edad materna, la etnia, la frecuencia de ingesta de leche por parte del lactante y la diabetes gestacional (395), sin embargo, nuestros resultados no muestran asociaciones frente a la edad materna (Figura 4.11) ni la etnia (datos no mostrados) que hayamos podido observar. Del estudio de otros factores sobre los niveles de minerales en leche materna encontramos un efecto de la estación del año en que tuvo lugar el nacimiento sobre las concentraciones de calcio ($p=0.000$) y el ratio Ca/P ($p=0.024$), con niveles superiores en lactancias durante el Verano-Otoño (21 Junio – 21 Diciembre) e inferiores cuando éstas tuvieron lugar durante los meses de Invierno-Primavera (21 Diciembre – 21 Junio) (datos no mostrados). Estos resultados podrían estar respondiendo a un estatus materno de vitamina D diferente según el momento en el que tiene lugar el parto, ya que se trata de una variable dependiente de la exposición solar (84).

Recientemente se han publicado resultados en esta dirección que muestran cambios estacionales para las concentraciones de vitamina D en suero de mujeres lactantes que viven en Cincinnati cuya latitud coincide con la de nuestra localización (39°N) (84). En dicho estudio no se identificó un efecto del estatus materno de vitamina D sobre el de su descendencia, sino que más bien la exposición solar de ambos, madre e hijo/a, es el principal determinante de los niveles en sangre de esta vitamina.

El estatus de vitamina D se ha correlacionado previamente de forma inversa con los niveles de la hormona paratiroidea cuya función regula el metabolismo óseo. Junto con la activación de la vitamina D, aumentan la absorción de calcio intestinal y facilitan la mineralización ósea (398), lo cual podría explicar las menores concentraciones de calcio encontradas en nacimientos durante el Invierno-Primavera. De hecho, en un estudio publicado en 2015 se han reportado distintas concentraciones de vitamina D en suero materno durante el embarazo dependiendo de la estación del año (67), por lo que pensar en que la estación del parto tenga un efecto sobre los niveles de calcio en la leche materna es una observación plausible.

Por otro lado, la obesidad también es un factor que influye de manera negativa sobre el estatus de vitamina D al disolverse entre la masa grasa corporal y a su vez el estatus de vitamina D podría predisponer a la obesidad de la descendencia (67, 398, 399).

Nuestros resultados muestran que la leche materna presenta un perfil diferencial para el calcio, el fósforo y el ratio Ca/P en función del IMC materno, pero opuestos entre sexos del lactante

(Figura 4.12), con un IMC a los dos años menor en niñas de madres con sobrepeso frente a las de madres normopeso y al revés para los varones, tal y como ocurre para las variables antropométricas de crecimiento de la descendencia (Figuras 4.1 y 4.2).

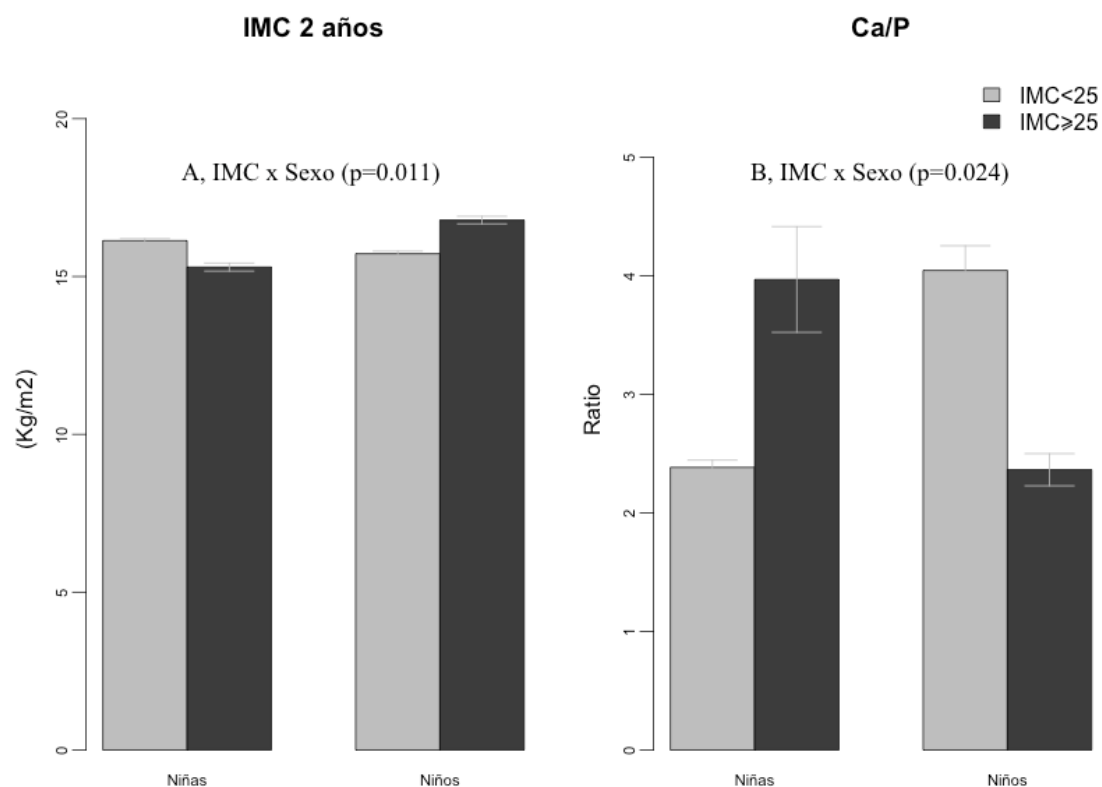


Figura 4.12 Efecto interacción entre el IMC materno (IMC < 25 o IMC ≥ 25) y el sexo del lactante (niño o niña) para el IMC de la descendencia hacia los dos años de edad (A) y el ratio (promedio de los tres primeros meses de lactancia) entre las concentraciones de calcio y fósforo (Ca/P) de la leche materna (B). Los datos son promedios de cada grupo más/menos el error tipo de la media. Los análisis estadísticos utilizados son la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente y también se aplicó el análisis post-hoc de Tukey para la evaluación de las diferencias inter-grupales, que no resultaron significativas en este caso. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Al no observar diferencias en las ingestas de estos minerales ni tampoco para la vitamina D (Tablas 4.10 y 4.11), se plantea una vía de conexión entre el estado metabólico materno (normopeso frente a sobrepeso/obesidad) y su efecto sobre el estatus de vitamina D que pudiera determinar los niveles de calcio y fósforo de forma distinta en función del sexo del lactante e independiente de la estación del parto, ya que la distribución de los casos no es significativamente distinta entre grupos por IMC materno ni sexo del lactante (Tabla 4.1).

De este modo, los niveles del trinomio vitamina D – calcio – Ca/P durante la lactancia podrían venir influidos por el IMC materno y a su vez explicar en parte la distinta evolución del IMC de la descendencia en función del sexo. Se trata pues de una posible vía de mediación distinta según el sexo del lactante que podría relacionar la obesidad materna durante la lactancia con la mayor predisposición a la obesidad de la descendencia a través de los niveles de calcio presentes en la leche materna. Esta secuencia de interrelaciones será evaluada mediante análisis estadísticos complejos en el capítulo 4.4.3.5.

Del conjunto de factores estudiados también encontramos que el tipo de lactancia tuvo un efecto significativo sobre las concentraciones de azufre en leche materna ($p=0.000$), un dato del que no conocemos precedentes. Las concentraciones más altas se identificaron en el primer ($33.1\pm 38.2\text{mg}/100\text{mL}$) y segundo mes ($27.2\pm 29.1\text{mg}/100\text{mL}$) en leche de madres que siguieron lactancia mixta en comparación con las que siguieron lactancia exclusiva ($17.9\pm 7.2\text{mg}/100\text{mL}$, $p=0.015$ y $14.4\pm 8.9\text{mg}/100\text{mL}$, $p=0.018$ respectivamente). En el tercer mes los niveles se equipararon entre ambos grupos ($13.7\pm 6.9\text{mg}/100\text{mL}$ para lactancias mixtas frente a $13.8\pm 9.4\text{mg}/100\text{mL}$ en lactancias exclusivas).

El azufre es el sexto mineral mayoritario en la leche materna presentando concentraciones tres veces mayores en calostro que en leche madura. Su implicación en el metabolismo de la metionina (400) durante etapas perinatales podría ser relevante de cara a procesos de modulación epigenética sobre la predisposición a la obesidad de la descendencia (69), por lo que se trata de un mineral de interés durante la lactancia materna.

4.3.4 Concentración de los precursores de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)

La nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) es un coenzima que participa en la producción de energía celular mediante reacciones de reducción-oxidación (REDOX) así como en modificaciones post-traduccionales de las proteínas.

Los precursores dietéticos del coenzima NAD engloban un conjunto de compuestos con actividad vitamínica niacina (nicotinamida (NAM), ácido nicotínico (NA), nicotinamida ribósido (NR) y nicotinamida mononucleótido (NMN)). También es posible su biosíntesis *de novo* a partir del aminoácido triptófano, aunque en humanos es extremadamente ineficiente. El contenido y la ingesta de niacina total en los alimentos se suele expresar en equivalentes de niacina (EN).

El NAD parece intervenir en la regulación metabólica a través de las sirtuinas (401-403) y podría tener un papel relevante en la programación temprana de la obesidad por su implicación en la modulación epigenética en la etapa perinatal (404-406). De hecho, en la obesidad y en situaciones de resistencia a la insulina, los niveles intracelulares de NAD están disminuidos (407) y varios estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que el aumento de los niveles de NAD a partir de sus precursores, mejora el control del peso corporal y del gasto energético mediante sus efectos en regiones reguladoras de la ingesta y el metabolismo energético a nivel hipotalámico (408-410).

La enzima reguladora de los niveles intracelulares de NAD conocida como nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT) o visfatina, modula procesos involucrados en la patogénesis de la obesidad y otras alteraciones metabólicas relacionadas, al influir directamente sobre respuestas REDOX, apoptosis, metabolismo lipídico y de la glucosa, procesos inflamatorios y sobre la resistencia a la insulina (407). Se trata de una enzima que ha sido reconocida como una adipoquina desde 2005 y cuyos niveles plasmáticos altos se han observado más altos en humanos obesos en comparación con normopeso (411). A nivel perinatal, esta enzima se ha relacionado con la mortalidad neonatal en mujeres con obesidad durante el embarazo, en las que ésta está aumentada (412) y sus niveles en leche materna podrían estar vinculados con la adiposidad de la descendencia (413).

Concentración en leche madura

La Tabla 4.34 presenta la concentración de los compuestos bioactivos precursores de NAD, niacina - evaluado como su suma- y los equivalentes de niacina - que han tenido en cuenta el contenido en triptófano de la leche materna (60µg triptófano equivalen a 1µg de niacina). Los resultados se han determinado en leche al tercer mes de lactancia.

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(µg/100mL)	N=45	N=27	N=18		N=25	N=20		N=16	N=9	N=11	N=9	
NAM	25.0 (18.0)	25.5 (17.8)	24.2 (18.7)	0.813	20.4 (11.6)	30.7 (22.7)	0.079	19.3 (10.9)	22.5 (13.2)	34.6 (22.3)	25.8 (23.7)	0.270
NA	16.0 (37.6)	0.45 (0.25)	34.7 (52.3)	0.217	20.9 (50.3)	10.2 (17.2)	0.640	0.23 (0.07)	41.6 (71.0)	0.68 (0.02)	24.4 (22.5)	0.722
NR	58.2 (66.0)	57.3 (59.2)	59.4 (76.9)	0.923	66.3 (72.4)	48.0 (57.2)	0.347	55.9 (51.1)	84.9 (101)	59.5 (72.1)	33.9 (29.5)	0.186
NMN	29.9 (16.2)	30.7 (12.6)	28.7 (21.3)	0.735	32.7 (17.5)	26.8 (14.3)	0.231	31.4 (12.3)	35.5 (27.0)	29.6 (13.5)	23.3 (15.3)	0.327
NIACINA	116 (72.5)	114 (66.8)	119 (82.2)	0.827	122 (78.7)	108 (65.1)	0.520	107 (58.3)	149 (104)	124 (79.5)	88.5 (37.3)	0.086
EN	125 (76.1)	121 (65.2)	130 (90.6)	0.759	133 (89.7)	113 (51.4)	0.446	116 (68.4)	161 (119)	131 (63.0)	98.5 (37.9)	0.180

Tabla 4.34 Concentración de precursores de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (µg/100mL) en leche materna al tercer mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. NAM, nicotinamida; NA, ácido nicotínico; NR, nicotinamida ribósido; NMN, nicotinamida mononucleótido; NIACINA = NAD + NAC + NR + NMN; EN = niacina total + equivalentes de niacina a partir del triptófano de acuerdo a la relación 60mg triptófano = 1mg niacina. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Así, el promedio de niacina total fue de $116.0 \pm 72.5 \mu\text{g}/100\text{mL}$. Los niveles de niacina entendida como la suma de NAM + NA en leche madura que encontramos en la bibliografía se sitúan en el rango de $90\text{-}180 \mu\text{g}/100\text{mL}$ (94, 392). Recientemente se han determinado ambos componentes por separado en población china, obteniendo concentraciones en un rango entre $19\text{-}767.3 \mu\text{g}/100\text{mL}$ para la NAM y entre $0\text{-}94 \mu\text{g}/100\text{mL}$ para el NA en leche humana de entre 31-100 días tras el parto (414). El contenido en niacina (NAM+NA) aumenta durante la maduración de la leche desde 28 hasta $111 \mu\text{g}/100\text{mL}$ y el valor promedio hallado a los tres meses postparto es de $89 \pm 78 \mu\text{g}/100\text{mL}$ (415), valor cercano al obtenido en la población estudiada.

En lo relativo a los precursores NR y NMN, en la actualidad no se disponen de valores en leche materna para poder referenciar y comparar los resultados obtenidos, si bien el primer precursor ha sido identificado previamente en leche de vaca (416, 417).

Efecto de los factores de estudio

Recientemente, se ha descrito una relación entre los niveles de niacina en leches de fórmula, veinte veces superior a los que encontramos en leche materna, y su posible implicación con una mayor predisposición a la obesidad en la edad adulta (406). Además, también se ha asociado un dimorfismo sexual para el efecto del aporte de NMN sobre la mejora de la sensibilidad a la insulina, obteniendo una mejora más relevante en hembras diabéticas que en machos (401).

En este estudio, la evaluación de la influencia de los factores de interés (sexo del lactante e IMC materno) no presentó diferencias significativas asociadas. Tampoco obtuvimos cambios debidos a otros factores (edad gestacional, tipo de lactancia, tipo de parto, estación del año, edad materna, etnia o número de partos previos).

Sin embargo, el análisis individualizado de los precursores mostró una tendencia a mayores concentraciones de NR en función de la edad, obteniendo un promedio de $41.8 \pm 2.0 \mu\text{g}/100\text{mL}$ las mujeres con menos de 32 años y de 80.6 ± 4.0 en aquellas de edad igual o superior a 32 años. Este precursor de la niacina se encuentra en leche y cerveza en pequeñas cantidades y se le ha atribuido una función protectora frente al desarrollo de resistencia a la insulina y obesidad inducida por la dieta (404), pero también podría estar involucrado en el proceso de envejecimiento celular tal como otros precursores han mostrado una asociación con el estatus nutricional, la obesidad visceral y factores de inflamación (407). En todo caso, hasta la fecha se desconoce si tiene alguna función específica como componente de la leche materna.

Aunque el contenido en niacina de la leche materna varía en función de la ingesta materna de esta vitamina (57, 81), los resultados obtenidos en el presente estudio no pusieron de manifiesto correlación entre ambas variables. También se estudiaron las correlaciones frente a variables antropométricas maternas y del crecimiento de la descendencia, obteniendo tan solo una correlación negativa entre la ganancia de peso con el embarazo y los niveles de NMN en leche materna ($R=-0.859$, $p=0.005$), cuya intensidad es relevante.

4.3.5 Evolución del contenido de ARNs de pequeño tamaño y microARNs específicos

Las concentraciones promedio para los ARNs de pequeño tamaño totales, smallARNs y microARNs purificados a lo largo de los tres primeros meses de lactancia fueron de $9.4 \pm 5.0 \mu\text{g/mL}$, $6.9 \pm 4.7 \mu\text{g/mL}$ y $3.9 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$ respectivamente en la población estudiada (Tabla 4.35). La evolución a lo largo de los tres meses de lactancia fue decreciente para los ARNs totales ($p=0.001$) pero no para las fracciones de smallARNs y microARNs.

(μg/mL)	Total	Mes 1	Mes 2	Mes 3	p-valor				
	N=141	N=45	N=47	N=49	Tiempo	IMC	Pre-/término	Tipo lactancia	Estación
ARNs	9.42 (4.96)	11.6 (5.83)	9.05 (4.40)	7.83 (3.89)	0.001	0.007	0.047	0.002	0.001
smallARNs	6.87 (4.70)	7.78 (4.53)	6.91 (5.21)	6.00 (4.26)	0.154				
microARNs	3.94 (2.87)	4.39 (2.58)	3.94 (3.19)	3.53 (2.81)	0.343			0.049	

Tabla 4.35 Concentración de ARNs de pequeño tamaño ($\mu\text{g/mL}$) en leche materna durante los primeros tres meses consecutivos tras el parto. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar. ARNs, ácidos ribonucleicos de pequeño tamaño purificados; smallARNs, ácidos ribonucleicos entre 40-150 nucleótidos; microARNs, ácidos ribonucleicos entre 4-40 nucleótidos. El análisis estadístico principal responde a ANOVA de medidas repetidas. Se incluye el análisis por modelo lineal mixto para la evaluación longitudinal del efecto de los factores de interés (IMC materno y sexo del lactante), así como los efectos de los factores de confusión (nacimientos pre-/post- o a término, tipo de lactancia y estación del parto). El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$. No se muestran los resultados que no alcanzaron la significancia estadística.

Estos resultados corresponden a leche entera madura cuya extracción y purificación del ARN siguió un proceso de enriquecimiento o purificación en microARNs. La Figura 4.13 presenta un ejemplo de electroferograma representativo de una muestra de leche purificada donde se pueden observar las delimitaciones establecidas en función del número de nucleótidos para la clasificación de los tres grupos de ARNs que presentamos.

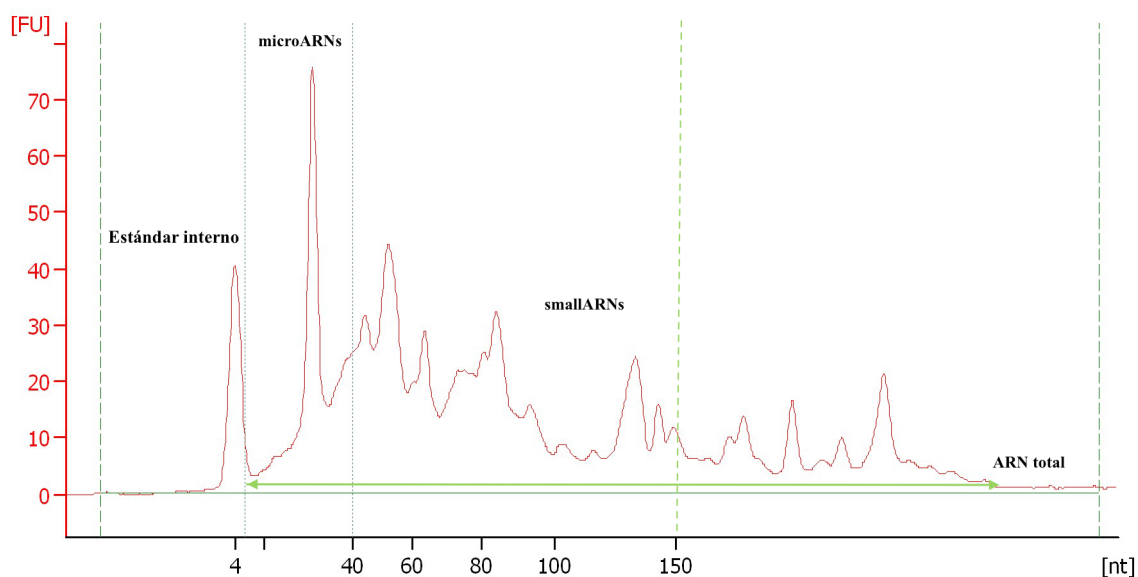


Figura 4.13 Electroferograma de una muestra de leche materna purificada y cuantificada mediante electroforesis capilar. [nt], nucleótidos; [FU], unidades de fluorescencia; ARNs, ácidos ribonucleicos de pequeño tamaño purificados; smallARNs, ácidos ribonucleicos entre 40-150 nucleótidos; microARNs, ácidos ribonucleicos entre 4-40 nucleótidos.

En un estudio comparativo de aplicación de distintos kits para la extracción y purificación de ARN total y microARNs en fracciones de la leche materna y mediante el uso de distintos kits se obtuvieron concentraciones de entre 7 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el ARN total en la fracción lipídica y de entre 1-13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los microARNs (418). En mujeres chinas, el promedio de ARN total extraído del suero en leche madura resultó de 33.2 \pm 32.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diferenciándose significativamente de la concentración detectada en calostro de 87.8 \pm 67.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Así, nuestros resultados se sitúan en los rangos descritos por otros autores, si bien hay que mencionar que se observan diferencias importantes según la etapa de lactancia o la fracción de la leche escogida para la extracción de los ARNs de pequeño tamaño.

Ha sido de nuestro interés valorar la presencia de microARNs específicos en leche (seleccionados tal como se explica en el capítulo 3.4.5.1). De los 26 microARNs seleccionados, 13 pudieron ser detectados y cuantificados de acuerdo a los criterios detallados en el capítulo 3.4.5.5. Así, las cantidades relativas de los microARNs miR-148a, miR-181a, miR-222, miR-103, miR-30a-5p, miR-27a, miR-27b, miR-200b, miR-let7a, miR-17, miR-let7b, miR-let7c y miR-146b y su evolución durante los tres primeros meses tras el parto se presentan en la Tabla 4.36.

(UR)	Total	Mes 1	Mes 2	Mes 3	p-valor			
	N=162	N=53	N=54	N=55	Tiempo	IMC	IMC x Sexo	EP
miR-148a	14.7 (28.8)	22.0 (45.4)	11.3 (13.7)	11.1 (15.5)	0.083			
miR-181a	2.58 (6.73)	2.93 (5.36)	3.33 (10.1)	1.49 (2.22)	0.292	0.016		
miR-222	1.73 (3.63)	2.99 (5.89)	1.04 (1.14)	1.20 (1.63)	0.007	0.033		
miR-103	1.32 (2.46)	2.21 (3.81)	0.90 (1.25)	0.90 (1.27)	0.004			
miR-30a-5p	46.7 (66.0)	47.8 (71.5)	37.3 (41.3)	54.9 (78.9)	0.388			
miR-27a	0.27 (0.59)	0.40 (0.81)	0.18 (0.27)	0.23 (0.56)	0.142	0.016		
miR-27b	0.12 (0.21)	0.19 (0.27)	0.11 (0.21)	0.08 (0.11)	0.028			
miR-200b	6.25 (10.2)	9.06 (14.7)	3.68 (4.48)	5.87 (7.71)	0.018			0.038
miR-let-7a	3.80 (6.83)	5.44 (10.0)	2.64 (3.74)	3.25 (4.56)	0.085			
miR-17	3.45 (4.66)	4.88 (6.39)	2.55 (3.31)	2.95 (3.42)	0.021			
miR-let-7b	19.3 (28.3)	26.5 (41.5)	14.8 (17.4)	16.9 (19.3)	0.073			
miR-let-7c	1.81 (2.96)	2.82 (4.51)	1.37 (1.76)	1.27 (1.48)	0.009		0.037	
miR-146b	20.8 (40.9)	35.7 (65.5)	12.0 (12.8)	14.8 (17.7)	0.003			0.025

Tabla 4.36 Concentración de trece microARNs específicos (unidades relativas) en leche materna durante los primeros tres meses consecutivos tras el parto. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar. El análisis estadístico principal responde a ANOVA de medidas repetidas. Se incluye el análisis por modelo lineal mixto para la evaluación longitudinal del efecto de los factores de interés (IMC materno y sexo del lactante), así como los efectos de los factores de confusión (nacimientos pre-/post- o a término, tipo de lactancia y estación del parto (EP)). El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$. No se muestran los resultados que no alcanzaron la significancia estadística.

Las cantidades relativas más altas se obtuvieron para el miR-30a-5p con un promedio de 46.7 ± 66.0 ur (unidades relativas), seguido del miR-146b (20.8 ± 40.9 ur), el miR-let-7b (19.3 ± 28.3 ur) y el miR-148a (14.7 ± 28.8 ur), siendo éste último el que se ha descrito como el microARN más abundante en los exosomas de la leche humana hasta la fecha (42, 216).

La evolución a lo largo de los tres meses de lactancia mostró una disminución significativa para los microARNs miR-103 ($p=0.006$), miR-27b ($p=0.030$), y miR-let-7c ($p=0.010$). Además, un grupo de microARNs (miR-222, miR-200b, miR-17 y miR-146b) mostró cambios significativos en su evolución siguiendo un patrón bifásico, con una disminución el segundo mes en comparación con el primero, seguida de un ligero aumento en el tercer mes que no llegó a superar los niveles registrados al primer mes tras el parto.

En la actualidad existen aún pocos datos de niveles de microARNs específicos en leche y a lo largo de la lactancia. Si bien se ha descrito una tendencia a disminuir los niveles relativos de varios microARNs entre el calostro y la leche madura en humanos (419), así como en los primeros seis meses tras el parto y también tras la introducción de los alimentos a partir de los 6 meses en humanos, con resultados significativos para el miR-181a (420). En leche de vaca también se ha descrito una reducción progresiva entre el calostro y la leche madura para varios microARNs con potenciales funciones inmunológicas y que para el miR-27b coincide con

nuestros resultados (421). Así mismo, en una especie marsupial se ha descrito una evolución del miR-30a en una especie marsupial similar a la que observamos en este estudio (44). En conjunto, se sugiere que la etapa de lactancia es relevante en relación con la concentración de distintos microARNs presentes en leche.

Efecto del IMC materno y sexo del lactante

El análisis longitudinal de las concentraciones de ARNs de pequeño tamaño resultó en diferencias significativas en la evolución según el IMC materno ($p=0.007$) con mayores niveles en la leche de madres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ durante los primeros tres meses de lactancia (Figura 4.14). La evolución no fue diferente al estudiar las concentraciones según el sexo del lactante.

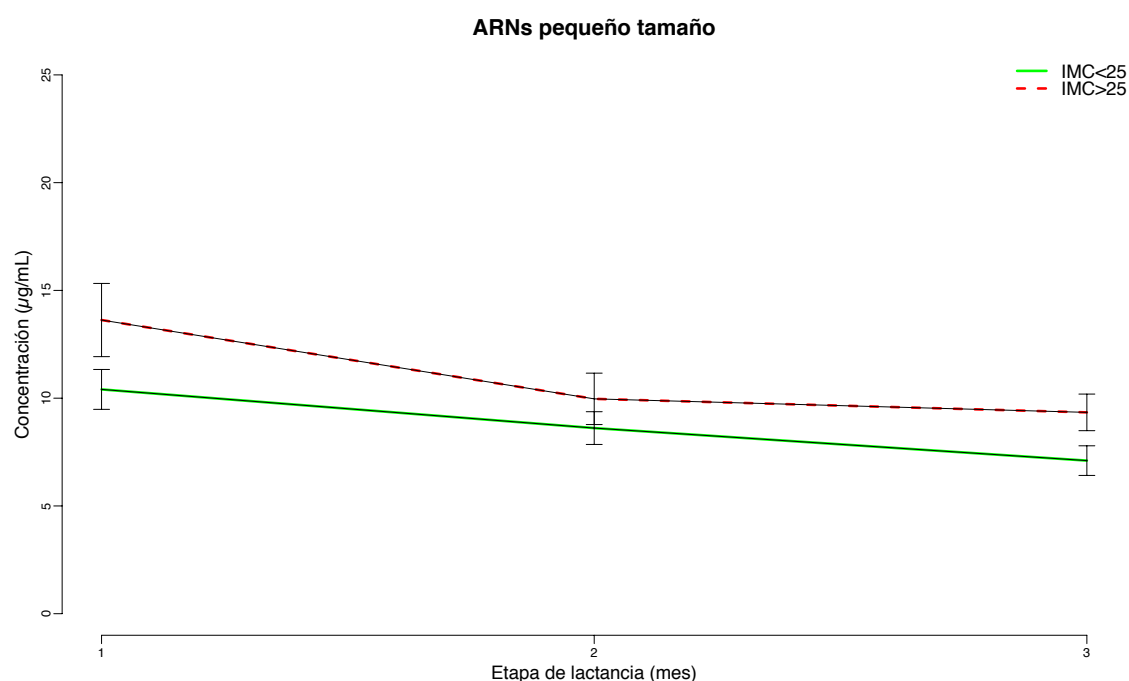


Figura 4.14 Evolución de las concentraciones de ARNs de pequeño tamaño ($\mu\text{g/mL}$) durante los primeros tres meses consecutivos tras el parto en función del IMC materno. Los datos son promedios de cada grupo más/menos el error tipo de la media. El análisis estadístico se ha realizado mediante modelo lineal mixto para la evaluación longitudinal del efecto del IMC materno. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Al estudiar el efecto de los factores de interés para cada uno de los meses por separado (Tablas 4.37-39) observamos un efecto del sexo sobre los smallARNs en el primer mes con valores mayores en leche de madres que tuvieron una niña $9.3 \pm 4.3 \mu\text{g/mL}$ en comparación con las que tuvieron un niño $6.2 \pm 4.3 \mu\text{g/mL}$ ($p=0.022$).

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(µg/mL)	N=45	N=29	N=16		N=23	N=22		N=17	N=6	N=12	N=10	
ARNs	11.6 (5.83)	10.4 (4.98)	13.6 (6.79)	0.109	11.8 (5.58)	11.3 (6.19)	0.746	11.0 (5.48)	14.3 (5.57)	9.64 (4.30)	13.2 (7.69)	0.959
smalARNs	7.78 (4.53)	7.35 (4.21)	8.56 (5.11)	0.427	9.27 (4.32)	6.21 (4.29)	0.022	8.90 (4.11)	10.3 (5.12)	5.14 (3.38)	7.50 (5.06)	0.733
microARNs	4.39 (2.58)	4.03 (2.44)	5.05 (2.76)	0.230	4.98 (2.43)	3.78 (2.64)	0.119	4.71 (2.50)	5.74 (2.24)	3.07 (2.09)	4.63 (3.07)	0.745

Tabla 4.37 Concentración de ARNs de pequeño tamaño (µg/mL) en leche materna al primer mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. ARNs, ácidos ribonucleicos de pequeño tamaño purificados; smalARNs, ácidos ribonucleicos entre 40-150 nucleótidos; microARNs, ácidos ribonucleicos entre 4-40 nucleótidos. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(µg/mL)	N=47	N=32	N=15		N=23	N=24		N=19	N=4	N=13	N=11	
ARNs	9.05 (4.40)	8.61 (4.30)	9.97 (4.62)	0.346	9.45 (5.56)	8.65 (2.96)	0.545	8.38 (4.95)	14.6 (6.17)	8.95 (3.28)	8.30 (2.64)	0.022
smalARNs	6.91 (5.21)	6.83 (4.88)	7.08 (6.04)	0.889	7.52 (6.25)	6.33 (4.04)	0.446	6.75 (4.90)	11.2 (11.0)	6.96 (5.05)	5.59 (2.40)	0.110
microARNs	3.94 (3.19)	3.79 (3.13)	4.26 (3.40)	0.653	4.08 (3.64)	3.81 (2.76)	0.775	3.58 (2.92)	6.45 (6.06)	4.10 (3.51)	3.47 (1.59)	0.117

Tabla 4.38 Concentración de ARNs de pequeño tamaño (µg/mL) en leche materna al segundo mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. ARNs, ácidos

ribonucleicos de pequeño tamaño purificados; smallARNs, ácidos ribonucleicos entre 40-150 nucleótidos; microARNs, ácidos ribonucleicos entre 4-40 nucleótidos. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(µg/mL)	N=49	N=33	N=16		N=24	N=25		N=19	N=5	N=14	N=11	
ARNs	7.83 (3.89)	7.10 (3.95)	9.34 (3.40)	0.048	7.24 (3.24)	8.41 (4.42)	0.296	6.90 (3.22)	8.52 (3.33)	7.38 (4.89)	9.71 (3.52)	0.775
smalARNs	6.00 (4.26)	5.48 (4.47)	7.08 (3.69)	0.195	5.12 (3.53)	6.85 (4.77)	0.155	4.98 (3.74)	5.66 (2.89)	6.17 (5.38)	7.72 (3.95)	0.754
microARNs	3.53 (2.81)	3.14 (2.92)	4.33 (2.46)	0.144	2.78 (2.14)	4.24 (3.21)	0.067	2.63 (2.16)	3.37 (2.19)	3.83 (3.70)	4.77 (2.54)	0.913

Tabla 4.39 Concentración de ARNs de pequeño tamaño (µg/mL) en leche materna al tercer mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. ARNs, ácidos ribonucleicos de pequeño tamaño purificados; smallARNs, ácidos ribonucleicos entre 40-150 nucleótidos; microARNs, ácidos ribonucleicos entre 4-40 nucleótidos. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Hacia el segundo mes se observó un efecto interacción entre el IMC materno y el sexo del lactante ($p=0.022$) para las concentraciones de ARNs de pequeño tamaño totales que no obtuvo significancia en el análisis post-hoc. Al tercer mes esta misma fracción presentó diferencias significativas en función del IMC materno con valores mayores $9.34\pm 3.40\mu\text{g/mL}$ en mujeres cuyo $\text{IMC}\geq 25\text{kg/m}^2$ en comparación con las que tienen un $\text{IMC}<25\text{kg/m}^2$ $7.10\pm 3.95\mu\text{g/mL}$ ($p=0.048$).

En relación a la presencia de microARNs específicos, se observaron diferencias significativas asociadas al IMC materno para los niveles de expresión relativa del miR-181a ($p=0.016$), miR-222 ($p=0.033$) y miR-27a ($p=0.016$) que manifestó niveles superiores en mujeres con $\text{IMC}\geq 25\text{kg/m}^2$ para todos los casos (Figura 4.15).

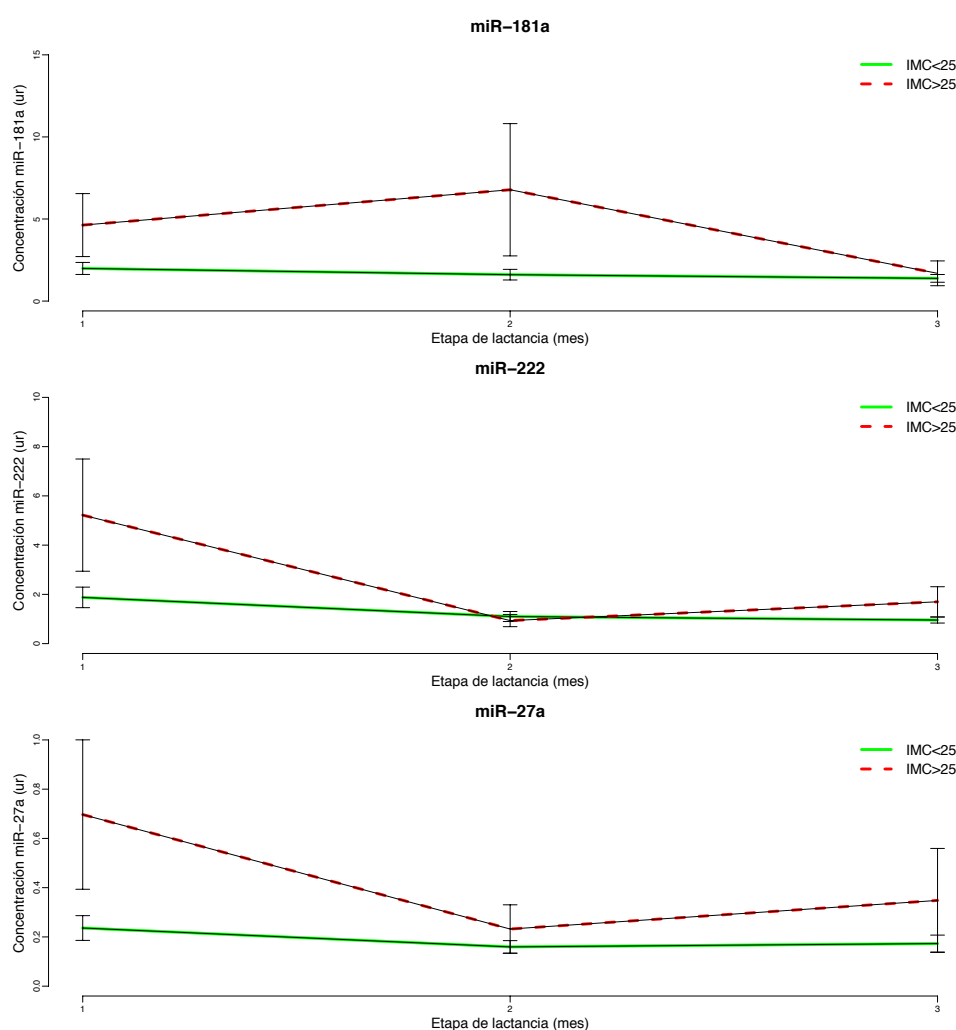


Figura 4.15 Evolución de las concentraciones (unidades relativas) de miR-181a, miR-222 y miR-27a durante los primeros tres meses consecutivos tras el parto en función del IMC materno. Los datos son promedios de cada grupo más/menos el error tipo de la media. El análisis estadístico se ha realizado mediante modelo lineal mixto para la evaluación longitudinal del efecto del IMC materno. El nivel de significancia fijado fue de $p\leq 0.05$.

Además, el miR-let-7c presentó un efecto interacción entre el sexo del lactante y el IMC materno ($p=0.037$) asociada a una evolución diferente según el IMC materno para cada sexo, con mayores niveles en leche de mujeres con $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$ que tuvieron una niña (Tablas 4.40-42).

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(ur)	N=53	N=34	N=19		N=28	N=25		N=20	N=8	N=14	N=11	
miR-148a	22.0 (45.4)	15.8 (24.4)	33.7 (69.4)	0.301	30.8 (59.4)	11.7 (14.9)	0.110	17.1 (28.4) ^a	65.1 (97.7) ^b	13.9 (17.9) ^a	8.61 (9.47) ^c	0.039
miR-181a	2.93 (5.36)	1.99 (2.14)	4.63 (8.36)	0.192	3.61 (6.77)	2.18 (3.09)	0.321	2.23 (2.51)	7.06 (11.9)	1.65 (1.47)	2.86 (4.39)	0.235
miR-222	2.99 (5.89)	1.88 (2.43)	5.22 (9.40)	0.167	3.13 (5.50)	2.83 (6.45)	0.861	2.17 (2.93)	5.52 (9.18)	1.46 (1.47)	4.95 (10.1)	0.967
miR-103	2.21 (3.81)	1.60 (2.27)	3.36 (5.61)	0.216	2.74 (4.94)	1.58 (1.68)	0.250	1.72 (2.81)	5.30 (7.88)	1.42 (1.21)	1.80 (2.24)	0.145
miR-30a-5p	47.8 (71.5)	34.5 (34.2)	72.3 (109)	0.167	56.2 (88.4)	38.4 (46.0)	0.366	37.4 (38.7)	101 (148)	30.5 (27.8)	49.5 (63.8)	0.286
miR-27a	0.40 (0.81)	0.24 (0.29)	0.70 (1.29)	0.151	0.50 (1.00)	0.28 (0.50)	0.314	0.27 (0.35)	1.05 (1.74)	0.18 (0.18)	0.41 (0.75)	0.235
miR-27b	0.19 (0.27)	0.15 (0.18)	0.26 (0.39)	0.253	0.20 (0.32)	0.17 (0.22)	0.626	0.16 (0.22)	0.31 (0.49)	0.13 (0.13)	0.22 (0.30)	0.664
miR-200b	9.06 (14.7)	6.87 (8.35)	13.2 (22.0)	0.254	11.0 (18.4)	6.73 (8.45)	0.273	7.27 (9.99)	20.5 (29.8)	6.29 (5.50)	7.35 (11.8)	0.153
miR-let-7a	5.44 (10.0)	3.85 (5.78)	8.62 (15.1)	0.225	6.73 (12.9)	3.87 (4.39)	0.281	4.35 (7.29)	12.7 (21.0)	3.14 (2.48)	5.01 (6.36)	0.276
miR-17	4.88 (6.39)	4.01 (4.50)	6.52 (8.89)	0.274	5.88 (7.94)	3.71 (3.73)	0.204	4.56 (5.36)	9.19 (12.2)	3.23 (2.87)	4.38 (4.78)	0.351
miR-let-7b	26.5 (41.5)	19.6 (19.9)	39.5 (64.2)	0.217	31.9 (53.9)	20.2 (18.1)	0.285	19.9 (22.2)	62.1 (91.7)	19.3 (16.9)	21.4 (20.6)	0.092
miR-let-7c	2.82 (4.51)	2.03 (1.97)	4.32 (7.07)	0.196	3.38 (5.84)	2.17 (2.08)	0.311	2.03 (2.19)	6.77 (10.0)	2.04 (1.68)	2.35 (2.64)	0.087
miR-146b	35.7 (65.5)	24.1 (29.1)	56.3 (101)	0.200	47.1 (83.5)	23.4 (35.5)	0.195	28.4 (34.7)	89.1 (138)	18.6 (19.6)	30.1 (50.7)	0.193

Tabla 4.40 Concentración de trece microARNs específicos (unidades relativas) en leche materna al primer mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Los

análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(ur)	N=54	N=36	N=18		N=29	N=25		N=22	N=7	N=14	N=11	
miR-148a	11.3 (13.7)	11.7 (14.6)	10.4 (12.0)	0.738	8.27 (9.05)	14.6 (17.2)	0.105	8.15 (9.42)	8.73 (8.33)	17.2 (19.4)	11.3 (13.9)	0.439
miR-181a	3.33 (10.1)	1.61 (1.94)	6.78 (17.1)	0.218	1.31 (1.52)	5.68 (14.6)	0.149	1.47 (1.70)	0.81 (0.55)	1.82 (2.32)	10.6 (21.3)	0.107
miR-222	1.04 (1.14)	1.10 (1.20)	0.94 (1.05)	0.611	0.95 (1.19)	1.15 (1.11)	0.520	1.05 (1.34)	0.63 (0.47)	1.17 (1.01)	1.13 (1.28)	0.580
miR-103	0.90 (1.25)	1.05 (1.47)	0.59 (0.52)	0.101	0.81 (0.95)	1.00 (1.53)	0.584	0.82 (1.04)	0.77 (0.69)	1.41 (1.95)	0.48 (0.37)	0.234
miR-30a-5p	37.3 (41.3)	39.0 (44.0)	33.8 (36.3)	0.647	28.5 (22.3)	47.1 (54.2)	0.120	30.1 (22.1)	23.8 (23.9)	52.5 (63.2)	40.2 (42.1)	0.807
miR-27a	0.18 (0.27)	0.16 (0.15)	0.23 (0.42)	0.484	0.20 (0.33)	0.17 (0.17)	0.686	0.14 (0.11)	0.38 (0.65)	0.19 (0.20)	0.14 (0.12)	0.057
miR-27b	0.11 (0.21)	0.09 (0.11)	0.14 (0.34)	0.553	0.13 (0.28)	0.07 (0.07)	0.299	0.09 (0.12)	0.26 (0.55)	0.08 (0.09)	0.06 (0.05)	0.156
miR-200b	3.68 (4.48)	4.33 (5.17)	2.46 (2.46)	0.093	4.47 (5.54)	2.86 (2.91)	0.208	4.97 (6.11)	2.91 (3.00)	3.41 (3.37)	2.21 (2.24)	0.760
miR-let-7a	2.64 (3.74)	3.06 (4.33)	1.87 (2.24)	0.214	2.36 (2.99)	2.95 (4.47)	0.596	2.54 (3.31)	1.79 (1.71)	3.90 (5.64)	1.91 (2.56)	0.606
miR-17	2.55 (3.31)	2.94 (3.79)	1.80 (2.01)	0.163	2.22 (3.33)	2.89 (3.32)	0.472	2.59 (3.74)	1.19 (1.45)	3.45 (3.96)	2.19 (2.27)	0.941
miR-let-7b	14.8 (17.4)	16.8 (19.7)	10.8 (11.3)	0.165	12.9 (15.1)	17.0 (20.0)	0.405	14.5 (16.7)	7.78 (6.79)	20.3 (23.9)	12.8 (13.4)	0.938
miR-let-7c	1.37 (1.76)	1.41 (1.62)	1.30 (2.07)	0.852	1.39 (1.87)	1.34 (1.68)	0.919	1.22 (1.24)	1.94 (3.23)	1.70 (2.11)	0.90 (0.75)	0.158

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(ur)	N=54	N=36	N=18		N=29	N=25		N=22	N=7	N=14	N=11	
miR-146b	12.0 (12.8)	13.3 (13.1)	9.75 (12.3)	0.364	13.3 (15.3)	10.5 (9.25)	0.435	14.5 (15.9)	10.1 (14.1)	11.3 (7.04)	9.48 (11.7)	0.757

Tabla 4.41 Concentración de trece microARNs específicos (unidades relativas) en leche materna al segundo mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(ur)	N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=21	N=8	N=15	N=11	
miR-148a	11.1 (15.5)	10.5 (12.1)	12.2 (20.7)	0.745	11.3 (13.8)	11.0 (17.4)	0.937	12.2 (14.5)	8.93 (12.4)	8.24 (7.53)	14.7 (25.5)	0.289
miR-181a	1.49 (2.22)	1.38 (1.41)	1.69 (3.29)	0.702	1.43 (1.18)	1.55 (3.01)	0.850	1.55 (0.99)	1.13 (1.63)	1.15 (1.87)	2.10 (4.15)	0.299
miR-222	1.20 (1.63)	0.96 (0.73)	1.70 (2.60)	0.251	1.22 (1.28)	1.19 (1.96)	0.955	1.10 (0.73)	1.56 (2.32)	0.75 (0.71)	1.79 (2.87)	0.552
miR-103	0.90 (1.27)	0.85 (0.91)	0.98 (1.80)	0.776	0.87 (0.83)	0.93 (1.65)	0.862	0.90 (0.72)	0.77 (1.10)	0.78 (1.14)	1.13 (2.21)	0.527
miR-30a-5p	54.9 (78.9)	52.3 (51.8)	59.7 (116)	0.793	53.8 (47.9)	56.1 (104)	0.916	60.0 (44.5)	37.3 (55.4)	41.5 (60.4)	76.1 (146)	0.218
miR-27a	0.23 (0.56)	0.17 (0.21)	0.35 (0.92)	0.423	0.19 (0.21)	0.28 (0.79)	0.563	0.19 (0.20)	0.18 (0.25)	0.14 (0.22)	0.47 (1.20)	0.297
miR-27b	0.08 (0.11)	0.08 (0.08)	0.09 (0.16)	0.778	0.08 (0.07)	0.08 (0.14)	0.803	0.08 (0.07)	0.05 (0.09)	0.06 (0.10)	0.11 (0.19)	0.267

	Total	IMC<25	IMC≥25	p-valor	Niña	Niño	p-valor	IMC<25 Niña	IMC≥25 Niña	IMC<25 Niño	IMC≥25 Niño	p-valor
(ur)	N=55	N=36	N=19		N=29	N=26		N=21	N=8	N=15	N=11	
miR-200b	5.87 (7.71)	5.46 (5.12)	6.60 (11.1)	0.674	6.66 (6.42)	4.98 (8.99)	0.444	6.16 (4.18)	7.90 (10.4)	4.45 (6.26)	5.66 (11.9)	0.909
miR-let-7a	3.25 (4.56)	2.50 (2.01)	4.62 (7.11)	0.232	3.46 (3.84)	2.99 (5.39)	0.726	3.02 (2.16)	4.56 (6.50)	1.70 (1.48)	4.67 (7.91)	0.599
miR-17	2.95 (3.42)	2.78 (2.74)	3.27 (4.50)	0.669	3.11 (2.88)	2.77 (3.98)	0.724	2.99 (2.33)	3.41 (4.17)	2.49 (3.29)	3.16 (4.92)	0.899
miR-let-7b	16.9 (19.3)	15.9 (16.3)	18.6 (24.3)	0.671	18.4 (16.4)	15.1 (22.2)	0.539	17.5 (11.4)	20.9 (26.4)	13.8 (21.7)	16.9 (23.8)	0.979
miR-let-7c	1.27 (1.48)	1.19 (1.12)	1.44 (2.03)	0.624	1.37 (1.31)	1.16 (1.67)	0.604	1.30 (0.86)	1.57 (2.16)	1.03 (1.42)	1.34 (2.02)	0.977
miR-146b	14.8 (17.7)	13.3 (12.6)	17.4 (24.5)	0.507	18.0 (19.2)	11.4 (15.6)	0.176	16.0 (12.2)	22.8 (30.7)	9.92 (12.7)	13.5 (19.4)	0.752

Tabla 4.42 Concentración de trece microARNs específicos (unidades relativas) en leche materna al tercer mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el IMC materno, sexo del lactante y la interacción entre ambos factores. Los análisis estadísticos utilizados son el test de la *t* de Student, para las agrupaciones independientes por IMC materno y sexo del lactante, y la ANOVA de dos factores, para la evaluación por ambos factores de interés simultáneamente. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Al analizar los mismos factores para cada mes de forma independiente (Tablas 4.40-42) se observó un efecto interacción entre el sexo y el IMC materno para el miR-148a ($p=0.039$) al primer mes de lactancia. Además el análisis post-hoc fue significativo mostrando niveles superiores en leches de mujeres con $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$ en comparación con las madres con $IMC < 25 \text{kg/m}^2$ que tuvieron una niña ($p=0.046$) y frente a las que con $IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$ tuvieron un niño ($p=0.036$). Esta misma tendencia se observó para el miR-27a ($p=0.057$) hacia el segundo mes sin obtener la significancia estadística en el análisis post-hoc. Si bien hay escasos estudios sobre miRNAs en leche, se han detectado mayores niveles de miR-30b y miR-378 en la leche que recibieron las niñas en comparación con los niños (419).

Estudio de correlaciones entre los niveles de ARNs de pequeño tamaño en leche materna frente a variables antropométricas maternas y del crecimiento de la descendencia

Los resultados del estudio de correlaciones entre las concentraciones de las distintas fracciones de ARNs de pequeño tamaño, los microARNs individuales y las variables antropométricas maternas y de la descendencia se presentan en la Figura 4.16. En este caso hemos trabajado con los valores del primer mes de lactancia debido a que observamos cambios evolutivos durante el periodo de lactancia evaluado. Dado que las variables relacionadas con los miRNAs no cumplían el criterio de normalidad, se utilizó el test de correlación de Spearman para extraer así las correlaciones significativas más robustas.

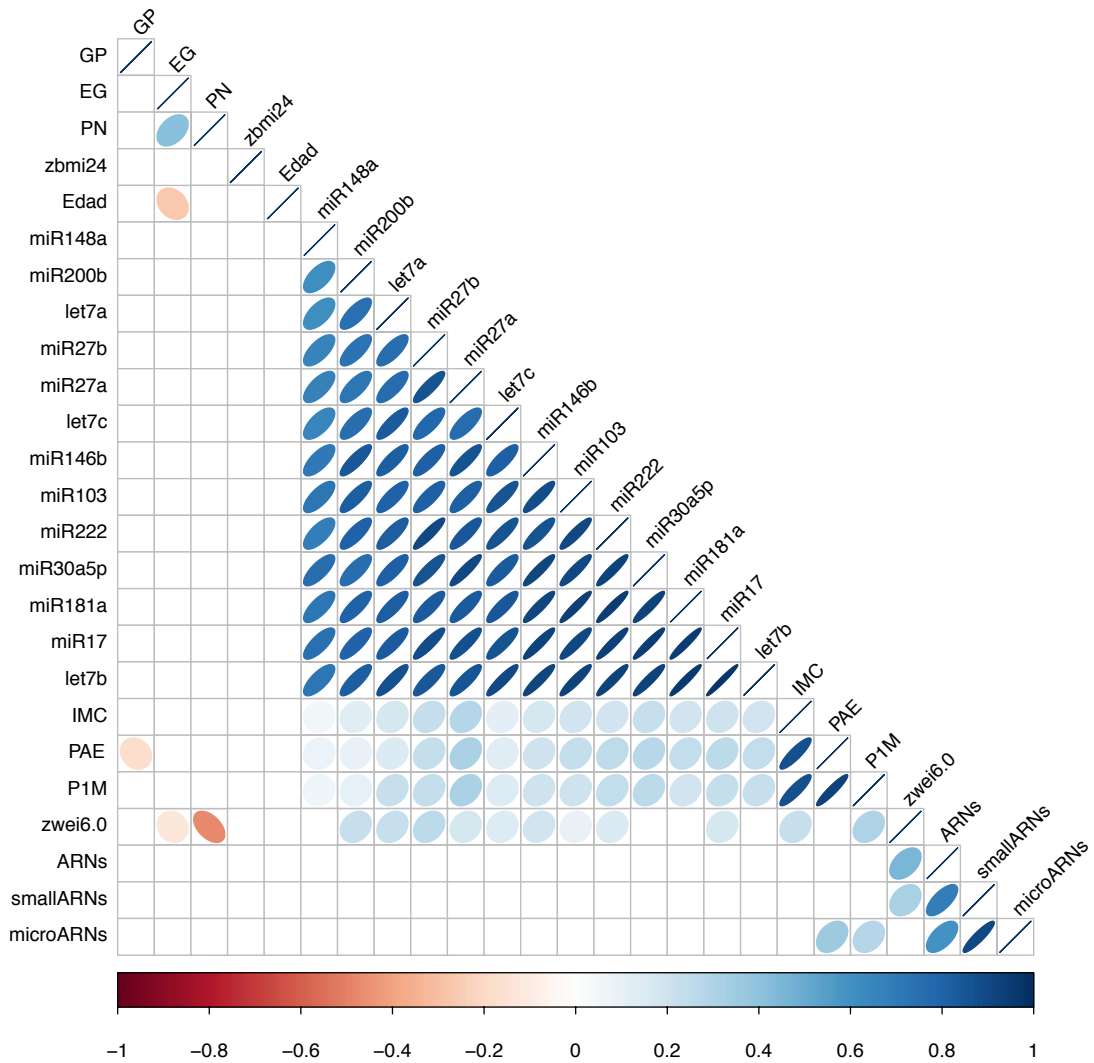


Figura 4.16 Correlograma de las concentraciones de ARNs de pequeño tamaño, smallARNs, microARNs y trece microARNs específicos en leche materna al mes tras el parto y variables antropométricas maternas y de la descendencia. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$, quedando en blanco aquellas correlaciones no significativas estadísticamente. Las correlaciones positivas en azul y las negativas en rojo. La intensidad de los colores responde a la intensidad de la correlación de Spearman. El orden de las variables responde a una agrupación jerárquica de clusters. ARNs, ácidos ribonucleicos de pequeño tamaño purificados; smallARNs, ácidos ribonucleicos entre 40-150 nucleótidos; microARNs, ácidos ribonucleicos entre 4-40 nucleótidos. PAE, peso antes del embarazo; P1M, peso materno al mes de lactancia; IMC, índice de masa corporal materno promedio; GP, ganancia de peso durante el embarazo; EG, edad gestacional; PN, peso al nacer de la descendencia; zbmi24, z-scores para el IMC para la edad a los 24 meses; zwei6.0, velocidad de ganancia de peso entre el nacimiento y los 6 meses.

Se observó una correlación positiva de todos los microARNs específicos frente al IMC materno, el peso antes del embarazo y el peso al mes tras el parto. Si nos fijamos en el IMC promedio

observamos una correlación más intensa para el miR-27a ($R=0.282$, $p=0.001$), miR-27b ($R=0.236$, $p=0.005$), miR-30a-5p ($R=0.221$, $p=0.001$) y miR-17 ($R=0.203$, $p=0.010$) consecutivamente.

También se observó una correlación positiva entre los ARNs de pequeño tamaño ($R=0.454$, $p=0.004$), los smallARNs ($R=0.327$, $p=0.045$) y ocho microARNs específicos con la velocidad de la ganancia de peso de la descendencia durante los primeros seis meses de vida ($zwei0.6$).

Los microARNs específicos que presentaron una correlación significativa en orden de mayor a menor factor de correlación (R) fueron el miR-27b ($R=0.265$, $p=0.011$), miR-let-7a ($R=0.227$, $p=0.019$), miR-200b ($R=0.224$, $p=0.017$), miR-146b ($R=0.198$, $p=0.023$), miR-17 ($R=0.175$, $p=0.024$), miR-27a ($R=0.174$, $p=0.011$), miR-222 ($R=0.157$, $p=0.010$) y miR-let-7c ($R=0.146$, $p=0.042$).

En la actualidad se ha descrito una correlación negativa entre el peso y el IMC materno antes y al final del embarazo sobre los niveles de miR-30b, miR-let-7a y miR-378 en calostro. Por el contrario la ganancia de peso durante el embarazo presentó una correlación positiva con los tres microARNs analizados (419). Nuestros resultados no mostraron correlación entre la ganancia de peso durante el embarazo con los niveles de ARNs de pequeño tamaño ni microARNs específicos, sin embargo, la correlación positiva entre las variables de peso corporal materno y los niveles de prácticamente todos los microARNs determinados fue consistente, así como con la velocidad en la ganancia de peso infantil.

De entre los microARNs estudiados, miR-148a, miR-27a y miR-27b se han relacionado previamente con la lipogénesis, estos dos últimos y el miR-146b con la adipogénesis, el miR-181a con la resistencia a la insulina y ambos últimos tienen como diana el gen que codifica para la SIRT1, proteína deacetilasa dependiente de NAD con funciones epigenéticas y que se ha relacionado con procesos de regulación de la ingesta, la resistencia a la insulina y el envejecimiento (422). Las correlaciones que se observan en este estudio entre estos microARNs, el IMC materno y el incremento de peso infantil de 0 a 6 meses, aporta información que podría ser útil a la hora de entender y profundizar en los mecanismos moleculares mediante los cuales estos microARNs regulan los procesos de lipogénesis, adipogénesis, resistencia a la insulina, regulación de la ingesta y del metabolismo energético durante etapas perinatales con potenciales funciones de programación del desarrollo de obesidad en la edad adulta.

Estudio longitudinal de la influencia de variables de confusión

El análisis longitudinal presentó diferencias significativas en la evolución de las concentraciones de ARNs de pequeño tamaño asociadas al nacimiento pre/post o a término ($p=0.047$), la estación en la que tuvo lugar el nacimiento ($p=0.001$) y el tipo de lactancia ($p=0.002$) (Tabla 4.35). Específicamente se observaron niveles más altos en la leche de madres que tuvieron partos pre-término, durante los meses de Invierno-Primavera y que siguieron lactancia mixta. Además, la fracción de microARNs totales también presentó diferencias significativas asociadas al tipo de lactancia ($p=0.049$) con niveles superiores en caso de seguir lactancia mixta en comparación con la lactancia exclusiva.

Para los microARNs específicos, solo observamos diferencias asociadas a la estación en la que tuvo lugar el parto sobre la evolución de los niveles de miR-200b ($p=0.038$) y miR-146b ($p=0.025$).

Al desgranar los resultados para los distintos meses (Tabla 4.43), observamos que al primer mes tras el parto la diferencia asociada a la estación en la que tuvo lugar el nacimiento es significativa para la mayoría de los microARNs estudiados al comparar entre mujeres que dieron a luz durante los meses de Verano - Otoño (21 Junio - 21 Diciembre), en comparación con las que dieron a luz durante el Invierno - Primavera (21 Diciembre - 21 Junio), con un patrón consistente que muestra niveles más elevados si los nacimientos tuvieron lugar durante los meses de Invierno-Primavera.

	Mes 1				Mes 2				Mes 3			
	Total	Verano	Invierno	p-valor	Total	Verano	Invierno	p-valor	Total	Verano	Invierno	p-valor
($\mu\text{g/mL}$)	N=45	N=17	N=28		N=47	N=18	N=29		N=49	N=20	N=29	
ARNs	11.6 (5.83)	8.17 (2.95)	13.6 (6.21)	<0.001	9.05 (4.40)	8.42 (5.22)	9.44 (3.85)	0.480	7.83 (3.89)	6.75 (3.63)	8.58 (3.95)	0.102
smallARNs	7.78 (4.53)	5.94 (3.84)	8.89 (4.61)	0.026	6.91 (5.21)	6.73 (6.12)	7.03 (4.67)	0.861	6.00 (4.26)	5.21 (3.89)	6.55 (4.48)	0.273
microARNs	4.39 (2.58)	3.45 (2.19)	4.96 (2.66)	0.046	3.94 (3.19)	4.04 (3.58)	3.89 (2.99)	0.882	3.53 (2.81)	3.14 (2.44)	3.79 (3.06)	0.410
(ur)	N=53	N=18	N=35		N=54	N=18	N=36		N=55	N=20	N=35	
miR-148a	22.0 (45.4)	9.70 (9.79)	27.9 (54.2)	0.061	11.3 (13.7)	13.8 (15.1)	10.1 (13.1)	0.391	11.1 (15.5)	9.54 (9.82)	12.0 (18.0)	0.507
miR-181a	2.93 (5.36)	1.36 (1.25)	3.75 (6.42)	0.040	3.33 (10.1)	1.85 (2.34)	4.07 (12.3)	0.300	1.49 (2.22)	1.00 (0.99)	1.77 (2.66)	0.134
miR-222	2.99 (5.89)	1.25 (1.21)	3.86 (7.04)	0.042	1.04 (1.14)	1.28 (1.55)	0.92 (0.87)	0.370	1.20 (1.63)	0.90 (0.90)	1.38 (1.92)	0.217
miR-103	2.21 (3.81)	1.04 (0.90)	2.77 (4.52)	0.035	0.90 (1.25)	1.22 (1.79)	0.74 (0.85)	0.291	0.90 (1.27)	0.67 (0.65)	1.03 (1.51)	0.234
miR-30a-5p	47.8 (71.5)	30.5 (29.3)	56.5 (84.3)	0.113	37.3 (41.3)	42.2 (46.7)	34.9 (39.0)	0.585	54.9 (78.9)	44.0 (46.3)	61.1 (92.6)	0.368
miR-27a	0.40 (0.81)	0.15 (0.13)	0.51 (0.97)	0.035	0.18 (0.27)	0.26 (0.42)	0.15 (0.14)	0.298	0.23 (0.56)	0.12 (0.09)	0.30 (0.70)	0.138
miR-27b	0.19 (0.27)	0.10 (0.11)	0.23 (0.32)	0.040	0.11 (0.21)	0.16 (0.34)	0.08 (0.11)	0.363	0.08 (0.11)	0.05 (0.04)	0.10 (0.13)	0.051
miR-200b	9.06 (14.7)	3.68 (4.99)	11.7 (17.0)	0.014	3.68 (4.48)	4.40 (6.34)	3.37 (3.43)	0.558	5.87 (7.71)	3.64 (4.22)	7.02 (8.83)	0.065
miR-let-7a	5.44 (10.0)	2.06 (1.98)	7.13 (11.9)	0.021	2.64 (3.74)	3.56 (4.36)	2.26 (3.46)	0.332	3.25 (4.56)	2.26 (1.80)	3.79 (5.47)	0.150
miR-17	4.88 (6.39)	2.77 (2.48)	5.90 (7.43)	0.029	2.55 (3.31)	3.40 (4.69)	2.09 (2.23)	0.274	2.95 (3.42)	2.22 (2.36)	3.37 (3.86)	0.175
miR-let-7b	26.5 (41.5)	13.9 (11.9)	32.6 (49.0)	0.038	14.8 (17.4)	18.2 (21.1)	13.1 (15.4)	0.373	16.9 (19.3)	11.5 (11.4)	19.9 (22.1)	0.070
miR-let-7c	2.82 (4.51)	1.41 (1.28)	3.51 (5.32)	0.033	1.37 (1.76)	1.89 (2.51)	1.11 (1.20)	0.224	1.27 (1.48)	0.86 (0.78)	1.51 (1.73)	0.059
miR-146b	35.7 (65.5)	11.0 (11.1)	47.3 (76.7)	0.010	12.0 (12.8)	10.5 (10.1)	12.8 (14.1)	0.537	14.8 (17.7)	9.88 (12.5)	17.5 (19.6)	0.090

Tabla 4.43 Concentración de ARNs de pequeño tamaño ($\mu\text{g/mL}$) y microARNs individuales (unidades relativas) en leche materna al primer, segundo y tercer mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según la estación en la que tuvo lugar el parto. ARNs, ácidos ribonucleicos de pequeño tamaño purificados; smallARNs, ácidos ribonucleicos entre 40-150 nucleótidos; microARNs, ácidos ribonucleicos entre 4-40 nucleótidos. El análisis estadístico utilizado es el test de la *t* de Student. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Por otro lado, también observamos niveles más bajos de varios microARNs (miR-148a, miR-181a, miR-103, miR-30a-5p, miR-200b, miR-17 y miR-let-7b) hacia los meses segundo y tercero si las mujeres siguieron lactancia mixta en comparación con las que siguieron lactancia exclusiva (Tabla 4.44).

	Mes 1				Mes 2				Mes 3			
	Total	Exclusiva	Mixta	p.valor	Total	Exclusiva	Mixta	p.valor	Total	Exclusiva	Mixta	p.valor
(ur)	N=53	N=45	N=8		N=54	N=47	N=7		N=55	N=45	N=10	
miR-148a	22.0 (45.4)	24.2 (48.3)	8.03 (11.3)	0.061	11.3 (13.7)	12.4 (14.2)	2.20 (1.53)	<0.001	11.1 (15.5)	12.6 (16.5)	4.35 (6.00)	0.011
miR-181a	2.93 (5.36)	2.89 (5.44)	3.18 (5.22)	0.891	3.33 (10.1)	2.61 (7.84)	8.15 (20.0)	0.495	1.49 (2.22)	1.64 (2.41)	0.79 (0.67)	0.046
miR-222	2.99 (5.89)	2.53 (4.50)	5.91 (11.5)	0.470	1.04 (1.14)	1.06 (1.12)	0.95 (1.41)	0.857	1.20 (1.63)	1.26 (1.72)	0.96 (1.18)	0.523
miR-103	2.21 (3.81)	2.24 (3.98)	1.99 (2.71)	0.835	0.90 (1.25)	0.95 (1.31)	0.56 (0.68)	0.246	0.90 (1.27)	1.01 (1.37)	0.38 (0.37)	0.011
miR-30a-5p	47.8 (71.5)	47.3 (71.5)	51.4 (77.4)	0.898	37.3 (41.3)	40.0 (43.5)	19.6 (13.8)	0.020	54.9 (78.9)	60.9 (85.8)	27.9 (18.9)	0.023
miR-27a	0.40 (0.81)	0.37 (0.81)	0.54 (0.89)	0.663	0.18 (0.27)	0.16 (0.15)	0.32 (0.67)	0.552	0.23 (0.56)	0.26 (0.62)	0.12 (0.07)	0.136
miR-27b	0.19 (0.27)	0.17 (0.26)	0.26 (0.36)	0.572	0.11 (0.21)	0.08 (0.10)	0.25 (0.55)	0.452	0.08 (0.11)	0.08 (0.12)	0.05 (0.03)	0.161
miR-200b	9.06 (14.7)	8.81 (15.0)	10.6 (13.1)	0.747	3.68 (4.48)	3.75 (4.57)	3.23 (4.15)	0.786	5.87 (7.71)	6.59 (8.25)	2.76 (3.49)	0.028
miR-let-7a	5.44 (10.0)	5.40 (10.5)	5.66 (7.22)	0.936	2.64 (3.74)	2.85 (3.89)	1.20 (2.19)	0.157	3.25 (4.56)	3.49 (4.90)	2.15 (2.24)	0.219
miR-17	4.88 (6.39)	4.81 (6.56)	5.35 (5.59)	0.822	2.55 (3.31)	2.79 (3.48)	1.00 (1.00)	0.009	2.95 (3.42)	3.25 (3.64)	1.59 (1.64)	0.034
miR-let-7b	26.5 (41.5)	26.9 (43.7)	23.8 (24.6)	0.790	14.8 (17.4)	16.1 (18.3)	5.98 (5.26)	0.005	16.9 (19.3)	18.6 (20.5)	8.81 (9.52)	0.029
miR-let-7c	2.82 (4.51)	2.85 (4.71)	2.66 (3.18)	0.893	1.37 (1.76)	1.30 (1.45)	1.88 (3.32)	0.659	1.27 (1.48)	1.38 (1.57)	0.78 (0.91)	0.120
miR-146b	35.7 (65.5)	35.4 (67.0)	37.8 (59.8)	0.925	12.0 (12.8)	12.9 (13.4)	6.59 (7.31)	0.088	14.8 (17.7)	16.2 (18.8)	8.76 (10.5)	0.104

Tabla 4.44 Concentración de microARNs individuales (unidades relativas) en leche materna al primer, segundo y tercer mes de lactancia. Se presentan los resultados promedios y, entre paréntesis, la desviación estándar para la población de estudio y clasificada por grupos, según el tipo de lactancia. El análisis estadístico utilizado es el test de la *t* de Student. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$.

Habiendo obtenido diferencias asociadas a cuatro factores (IMC materno, nacimientos pre/post o a término, estación del nacimiento y tipo de lactancia) para distintos microARNs específicos y para distintos meses, optamos por reducir dicha información mediante un modelo lineal mixto que incluyera todas las variables simultáneamente para corregir y magnificar el efecto más relevante y consistente en cada caso.

Así, obtuvimos un efecto significativo del tipo de lactancia sobre los niveles de miR-148a ($p=0.018$) con menores niveles cuando se siguió lactancia mixta, del IMC materno sobre los niveles de 181a ($p=0.034$) y miR-27a ($p=0.020$) con mayores niveles en leches de madres con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ y por último, la estación del nacimiento sobre los de miR-200b ($p=0.025$) y miR-146b ($p=0.018$), con mayores niveles para nacimientos durante el Invierno-Primavera.

En la actualidad, la bibliografía disponible sobre los factores que influyen en los niveles de microARNs específicos en leche materna es escasa por lo que en base a nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se presentan influencias significativas del IMC materno, el nacimiento pre-término, la estación del nacimiento y el tipo de lactancia sobre los niveles de distintos microARNs en leche materna.

4.4 Interconexiones nutricionales durante la lactancia materna que podrían predisponer a la obesidad en la edad adulta

4.4.1 Influencia de la dieta materna sobre la composición de la leche

La evaluación de las asociaciones entre las variables que describen la dieta materna frente a las que caracterizan la composición de la leche materna se realizó mediante un mapa de correlaciones (120 variables de la dieta materna x 115 variables de composición de la leche materna) de las que seleccionamos aquellas con un factor de correlación $R > 0.4$ y un nivel de significancia asociado de $p < 0.001$ (Tabla 4.45) con el fin de reducir el ruido de fondo que pudiera proceder de correlaciones fortuitas y manejar las asociaciones más intensas y significativas, de acuerdo a la corrección de Bonferroni estimada para 13800 correlaciones simultáneas. Así mismo incluimos en la descripción de los resultados las asociaciones cuyo factor de correlación fue de $R \geq \pm 0.2$ y el nivel de significancia de $p < 0.05$, que no se van a indicar para cada caso concreto sus valores para facilitar la lectura y seguimiento de este capítulo.

Los datos utilizados para la construcción del mapa de correlaciones fueron el promedio de los tres meses para los cuales disponemos del registro de las variables tanto dietéticas como de la composición de la leche materna a excepción de las proteínas totales y específicas y los miR que corresponden al primer mes de lactancia y los precursores de la niacina que fueron determinados el tercer mes de lactancia. Esto es debido a la disponibilidad de los datos o a la identificación de cambios evolutivos importantes según avanzaba la lactancia.

Influencia de la dieta materna sobre los lípidos y AG

Los **TGs totales** en leche materna madura correlacionaron negativamente con el ratio $AGPI + AGMI / AGS$ de la dieta (Tabla 4.45). Dicha observación resulta de asociaciones menos intensas frente al porcentaje de AGMI y los ratios de ingesta Omega 3/Omega 6 y $AGPI / AGS$. Las ingestas de vitamina E y fitoesteroles, especialmente de beta-sitosteroles y el ratio ácido fítico/zinc siguieron el mismo patrón, de forma que a mayores ingestas de estos factores dietéticos, menores fueron las concentraciones de TGs en la leche materna.

Dieta	Leche	R	Dieta	Leche	R	Dieta	Leche	R
AGPI+AGMI/AGS	TG totales	-0.44	Riboflavina	C18:4n3	0.42	EPA	C22:6n3	0.46
AGPI+AGMI/AGS	9,11-CLA	-0.46	Cromo	C18:4n3	0.43	Fibra total	C22:6n3	0.46
Lípidos	C8:0	0.43	Campesterol	C18:4n3	0.45	Biotina	C22:6n3	0.50
Esteárico	C8:0	0.45	Vitamina E	C20:0	0.44	Vitamina C	C22:6n3	0.43
AGMI	C8:0	0.49	Biotina	C20:4n3	0.49	Vitamina D	C22:6n3	0.48
Oleico	C8:0	0.48	Vitamina E	C20:4n3	0.47	Vitamina E	C22:6n3	0.49
Aluminio	C8:0	0.45	Magnesio	C20:4n3	0.48	Magnesio	C22:6n3	0.47
%AGMI	C14:1	-0.48	Beta-sitosteroles	C20:4n3	0.47	Cobre	C22:6n3	0.48
AGPI+AGMI/AGS	C14:1	-0.48	EPA	C20:5n3	0.53	AGPI/AGS	Omega 3	0.56
%AGMI	C15:0	-0.49	DHA	C20:5n3	0.45	Fibra total	Omega 3	0.53
AGPI+AGMI/AGS	C15:0	-0.53	AGPI/AGS	C20:5n3	0.52	Vitamina E	Omega 3	0.47
AGPI/AGS	C15:1	-0.43	Fibra total	C20:5n3	0.52	Magnesio	Omega 3	0.51
AGPI+AGMI/AGS	C15:1	-0.50	Biotina	C20:5n3	0.45	Na/K	Omega 3	-0.50
AGPI/AGS	C16:0	-0.52	Vitamina C	C20:5n3	0.44	Cobre	Omega 3	0.42
AGPI+AGMI/AGS	C16:0	-0.54	Vitamina D	C20:5n3	0.44	Beta-sitosteroles	Omega 3	0.51
Beta-sitosteroles	C16:0	-0.42	Vitamina E	C20:5n3	0.55	Fibra vegetal	AA/DHA	-0.46
Vitamina D	C16:2n4	0.47	Magnesio	C20:5n3	0.58	Tiamina	AA/DHA	-0.46
Magnesio	C16:2n4	0.47	Potasio	C20:5n3	0.43	Riboflavina	AA/DHA	-0.44
Selenio	C16:2n4	0.43	Na/K	C20:5n3	-0.45	Vitamina B5	AA/DHA	-0.48
AGPI+AGMI/AGS	C17:0	-0.50	Cobre	C20:5n3	0.47	Vitamina B6	AA/DHA	-0.45
AGPI+AGMI/AGS	C17:1	-0.45	Beta-sitosteroles	C20:5n3	0.56	Vitamina C	AA/DHA	-0.48
%AGS	C18:0	0.52	Biotina	C22:1n11	0.47	Zinc	AA/DHA	-0.43
AGPI/AGS	C18:0	-0.61	Vitamina B5	C22:1n9	0.42	Magnesio	AA/DHA	-0.45
AGPI+AGMI/AGS	C18:0	-0.48	Biotina	C22:1n9	0.60	Potasio	AA/DHA	-0.43
Vitamina B5	C18:1n7	0.46	Vitamina D	C22:1n9	0.44	cobre	AA/DHA	-0.46
Fitoesteroles	C18:1n9	0.46	Vitamina E	C22:1n9	0.53	Fibra total	Omega6/Omega3	-0.43
%AGMI	C18:2n6t	-0.46	Cobre	C22:1n9	0.43	Magnesio	Omega6/Omega3	-0.43
AGPI+AGMI/AGS	C18:2n6t	-0.44	Biotina	C22:5n3	0.50	AGPI/AGS	Proteinas totales	0.47

Dieta	Leche	R	Dieta	Leche	R	Dieta	Leche	R
AGPI/AGS	C18:3n3	0.53	Vitamina D	C22:5n3	0.48	Isoleucina	Sodio	0.42
Fibra total	C18:3n3	0.42	Cobre	C22:5n3	0.44	Prot/K	Azufre	0.47
Na/K	C18:3n3	-0.43				Sacarosa	Nicotinamida	0.50

Tabla 4.45 Factores de correlación de Pearson más significativos ($p < 0.001$) entre variables de la ingesta dietética y componentes analizados en la leche materna. Ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI), poliinsaturados (AGPI), Omega 6 (linoléico+gamma-linolénico+dihomo-gamma-linolénico+araquidónico), Omega 3 (alfa-linolénico+estearidónico+eicosatetraenoico+EPA+DPA) y Trans (trans-7-Octadecenoico+elaídico+linoelaídico). A partir de los datos individuales, se han calculado los ratios AGPI+AGMI/AGS, Omega 6/Omega 3 y ácido araquidónico (AA)/ ácido docasahexaenoico (DHA). Consultar tabla 4.16 para aclaraciones de nomenclatura de los ácidos grasos individuales.

Previamente se ha postulado que aunque la fracción de lípidos totales varía entre mujeres, esta variación es independiente de la dieta materna (80), sin embargo, el análisis de las correlaciones surgidas en este estudio apuntan una modulación de las concentraciones de lípidos de la leche materna en respuesta al tipo de ácidos grasos de la dieta, así como a otros componentes bioactivos de la dieta (vitaminas, minerales y fitoesteroides).

Las **concentraciones de AGNEs** en la leche presentaron una correlación negativa frente al ratio AGPI+AGMI/AGS, la ingesta de beta-sitosteroides y ácido fólico y positiva con la ingesta de teobromina y el ratio ácido fólico/zinc. Como se puede observar, estas asociaciones, tanto la dirección como los factores dietéticos están en la misma línea de las descritas para las concentraciones de TGs en leche materna.

El **perfil de AG** de la leche materna respondió ante la ingesta energética total y el porcentaje relativo a la ingesta de proteínas, lípidos y azúcares. Concretamente, la ingesta de lípidos totales correlacionó con los niveles de C8:0 ($R=0.43$, $p=0.001$), C20:0 ($R=0.29$, $p=0.025$) y C16:1n9 ($R=-0.32$, $p=0.012$) en leche. Observamos una correlación positiva entre la ingesta de ácido mirístico (C14:0) y los niveles de AGS de cadena media C15:0, C16:0, C17:0 y C18:0 en leche. La ingesta de AGMI presentó una correlación negativa frente a los niveles de los también monoinsaturados C14:1, C16:1n9 y C16:1n7. Por su lado, los AGPI determinaron más intensamente el perfil de AG en la leche materna, especialmente los de cadena larga y Omega 3, tal y como ya se ha identificado previamente (80). La ingesta total de AGPI supuso mayores niveles de C22:1n9 y de AGPI Omega 3 (C18:3n3, C20:4n3, C20:5n3, C22:5n3) y menores proporciones de saturados y monoinsaturados de cadena media (C14:1, C15:1, C16:0, C17:0, C16:1n9, C17:1) en leche.

Previamente se ha observado un porcentaje de AGCM en leche materna más elevado en respuesta a dietas ricas en hidratos de carbono y pobres en grasa (80). Nuestros resultados no mostraron una asociación frente a los carbohidratos totales, sin embargo sí observamos una asociación positiva entre la ingesta de lignina y fibra insoluble sobre el ácido caprílico, láurico y mirístico.

Hasta la fecha, las fracciones de ácidos grasos en leche materna que han recibido más atención en respuesta a la ingesta de los mismos en la dieta materna, han sido los poliinsaturados de cadena larga Omega 3 y Omega 6, y los *trans* (80, 106, 423, 424). Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que la dieta materna influye de forma importante sobre el tipo de grasas de la leche más allá de los antes mencionados e incluyendo también a otros macro- y micronutrientes con potencial modulador de los lípidos lácteos.

La ingesta de proteínas y aminoácidos presentó una correlación positiva sobre los niveles de C16:2n4, C18:1n9t, C22:1n9 y C22:6n3. El efecto de la ingesta proteica sobre los niveles de DHA en leche materna también ha sido reportado por otros autores (425). De hecho esto viene determinado porque se acumula en fuentes de origen animal enriquecidas en este ácido graso a lo largo de la cadena trófica, tales como el pescado que a su vez es un alimento proteico (20).

Tanto la ingesta de azúcares y fibra, así como de micronutrientes y los fitoesteroles presentaron múltiples correlaciones significativas sobre el perfil de AG en leche, evidenciando que esta fracción lipídica de la leche responde al conjunto de la dieta y no tan solo a sus componentes lipídicos como había sido propuesto hasta ahora (57, 424).

Las **correlaciones positivas más intensas ($R > 0.5$)** se observaron para la ingesta de AGS sobre los niveles de ácido esteárico en leche y los niveles de EPA en respuesta a la ingesta del mismo AG en la dieta. Así mismo, la ingesta de biotina presentó la correlación más intensa de todas ($R = 0.6$) sobre los niveles del ácido cis-11-Eicosenoico (C22:1n9) y también tuvo el mismo efecto sobre los niveles de C22:1n11, DPA y DHA. Por último, observamos como los ácidos grasos Omega 3 en leche materna se asociaron positivamente con las ingestas de fibra, vitamina E, magnesio y beta-sitosteroles (Tabla 4.45).

En cuanto a las **correlaciones negativas más intensas ($R < -0.5$)**, observamos que el ratio AGPI/AGS de la dieta determinó menores niveles de C16:0 y C18:0 significativamente y el ratio AGPI+AGMI/AGS los de C15:0, C15:1, C16:0 y C17:0 en la leche materna madura. Por último, el ratio Na/K presentó una correlación negativa intensa ($R < -0.5$) sobre el conjunto de AG Omega 3 en leche materna.

En conjunto, observamos que la calidad de la grasa de la dieta materna durante la lactancia se transfiere a través de la leche a la descendencia, pero que también existen otros nutrientes y bioactivos que son determinantes del perfil lipídico de la leche. Estos resultados reivindican la necesidad de llevar a cabo estudios que comprendan la totalidad de la dieta en la evaluación de los cambios en la composición de la leche materna, especialmente cuando se trata de la fracción grasa.

Influencia de la dieta materna sobre las proteínas y el perfil de aminoácidos

La **concentración de proteínas totales** en leche se correlacionó negativamente con el porcentaje de ingesta calórica debida a los AGS ($R = -0.33$, $p = 0.015$) y positivamente frente al porcentaje relativo a los AGPI de la dieta ($R = 0.33$, $p = 0.015$), de forma que el ratio AGPI/AGS presentó una correlación positiva significativa aún más intensa ($R = 0.47$, $p = 0.000$).

También observamos correlaciones positivas asociadas a los niveles de proteínas totales en la leche para las ingestas de fibra soluble, polisacáridos solubles e insolubles no celulósicos y negativas para las de colesterol y sodio ($-0.5 < R < -0.2$).

La **concentración de leptina** en leche materna se asoció positivamente a la ingesta de almidón y negativamente con el porcentaje de la energía obtenido de los azúcares ingeridos y de la ingesta de fitoesteroles totales mientras que la **adiponectina** en leche materna no se asoció con ninguna variable de la ingesta dietética.

Los **niveles de lactoferrina** presentaron una correlación positiva con las ingestas de cisteína, celulosa, lignina y polisacáridos insolubles no celulósicos, bromo y níquel. La correlación fue negativa con el ratio dietético de AG Omega 6/Omega 3 y el ratio entre la ingesta de ácido linoleico (LA) frente a la de alfa-linolénico (ALA).

Las **concentración de lisozima** en leche presentó una correlación positiva con la ingesta de vitamina B12, mientras que la **IgA** en leche materna presentó una correlación negativa frente a la ingesta de proteínas y la mayoría de aminoácidos de la dieta.

El **perfil de aminoácidos** en la leche no se asoció a la ingesta de macronutrientes (proteínas, carbohidratos y grasas). Sin embargo, se observaron correlaciones significativas entre la ingesta de los mismos y su presencia en la leche materna. Alanina y leucina fueron los aminoácidos que presentaron unas correlaciones negativas más intensas entre su concentración en leche y su ingesta cuantificada a partir de su presencia en los alimentos de la dieta, por lo que a mayores ingestas menores fueron los niveles de aminoácidos en leche materna.

No obtuvimos correlaciones entre las ingestas de carbohidratos o proteínas y los distintos aminoácidos frente al **ratio Trp/AaLN en leche materna**, tal y como podría esperarse (ver capítulo 4.3.2.3) aunque el % de Omega 6 y las ingestas de ARA, B5, tocoferoles, magnesio y níquel presentaron correlaciones significativas ($p < 0.05$).

En cualquier caso, las correlaciones para esta fracción de componentes fueron de menor intensidad en comparación con la fracción lipídica, de forma que tan solo aparece en la Tabla 4.45 la influencia del ratio AGPI/AGS de la dieta sobre las proteínas totales en la leche ($R=0.47$, $p < 0.001$).

Aun así, cabe destacar que la fracción proteica responde a distintos componentes de la dieta materna que no habían sido propuestos previamente (57, 59) y que llaman la atención en especial en lo referente a la relación inversa entre las ingestas de aminoácidos y su presencia en forma libre en la leche materna.

Influencia de la dieta materna sobre los minerales determinados

Las **concentraciones de calcio, potasio, magnesio y sodio** en leche correlacionaron negativamente con la ingesta energética a partir de los carbohidratos, y positivamente con la debida a las grasas y AGS de la dieta, especialmente el ácido palmítico.

Las **concentraciones de sodio y fósforo** en leche mostraron una relación positiva ante la ingesta de proteínas y aminoácidos de la dieta. Obtuvimos una correlación positiva intensa entre la ingesta de isoleucina y los niveles de sodio en leche ($R=0.42$, $p<0.001$). Además, los niveles de fósforo también correlacionaron positivamente ante la ingesta de fosfatidilcolina de la dieta ($R=0.26$, $p=0.043$).

Las **concentraciones de azufre** correlacionaron negativamente con las ingestas de glucosa y fructosa, pero positivamente con el ratio proteína/potasio del conjunto de la dieta de forma intensa ($R=0.47$, $p<0.001$).

El **ratio Na/K de la leche materna** correlacionó positivamente ante las ingestas de vitaminas B1, B5, B6, B9, zinc, cobre, selenio, yodo y ácido fólico.

Curiosamente, en ningún caso las ingestas de minerales correlacionaron con sus concentraciones en la leche materna, tal y como ha sido propuesto previamente (57). Las correlaciones encontradas para esta fracción de micronutrientes de la leche materna no cuentan con precedentes con los que contrastar los resultados.

Influencia de la dieta materna sobre los precursores de NAD

Los **niveles de nicotinamida** se correlacionaron positivamente con la ingesta de azúcares, especialmente de la sacarosa ($R=0.5$, $p<0.001$) y la lactosa, así como frente a la ingesta de calcio y fitoesteroles.

La **nicotinamida ribósido** respondió a las ingestas de hierro, mientras que la niacina total correlacionó también positivamente con el aporte energético debido a los ácidos grasos Omega 6 y Omega 3.

No encontramos una relación entre la ingesta de niacina y sus niveles en leche tal y como ha sido propuesto previamente (57).

Influencia de la dieta materna sobre los microARNs

Encontramos una correlación negativa entre las **concentraciones de ARN total** en leche y la ingesta de alanina y positiva frente al ratio Ca/P de la dieta. Los **smallARNs** correlacionaron negativamente con las ingestas de metionina y triptófano, mientras que las **concentraciones de microARNs** no presentaron ninguna correlación significativa con factores de correlación superiores a ± 0.2 .

En cuanto a los microARNs individuales cuantificados, las concentraciones en unidades relativas de **miR-222** se correlacionaron positivamente con las ingestas de proteínas, cisteína y ácido glutámico y el **miR-103** correlacionó negativamente con la ingesta de sacarosa.

4.4.2 Correlograma de las interconexiones Dieta materna – Leche madura – Crecimiento Infantil

La Figura 4.17 corresponde al correlograma entre los perfiles de ingesta de nutrientes sin suplementos PN1SS y PN2SS, seleccionados por representar el perfil de nutrientes que mejor explica la ingesta de nutrientes a partir de los alimentos; los patrones de consumo por grupos de alimentos PA1 y PA2, ambos extraídos por análisis de componentes principales en el capítulo 4.2.4; los perfiles de composición que explican la mayor parte de la variabilidad muestral para el conjunto de ácidos grasos (PAG) y aminoácidos (PAa) identificados en la leche madura en los capítulos 4.3.1.2 y 4.3.2.3 respectivamente y el resto de componentes determinados (triglicéridos, ácidos grasos no esterificados, proteínas totales y específicas, minerales, precursores de la nicotinamida adenina dinucleótido, ARNs de pequeño tamaño y microARNs específicos) además de un conjunto de variables antropométricas maternas y de la descendencia. Así mismo incluimos la ingesta materna de isoleucina por haberse identificado durante el proceso de análisis de los datos como una variable de interés en este estudio.

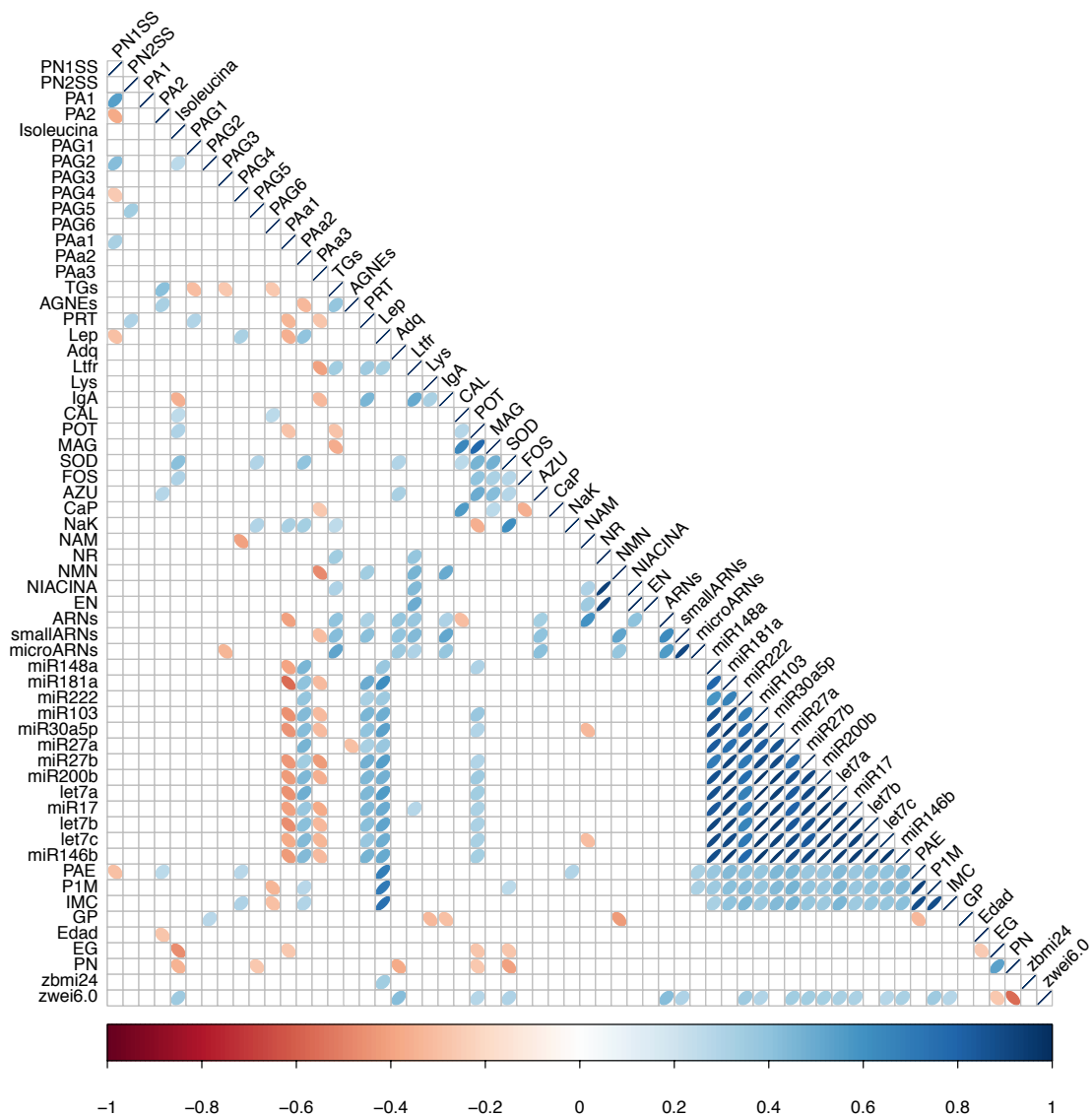


Figura 4.17 Correlograma entre los perfiles (PN1SS y PN2SS) y patrones dietéticos (PA1 y PA2), perfiles de ácidos grasos (PAG1-PAG6) y aminoácidos (PAA1-PAA3) y otros componentes de la leche madura y las variables antropométricas maternas y de la descendencia. El nivel de significancia fijado fue de $p \leq 0.05$, quedando en blanco aquellas correlaciones no significativas estadísticamente. Las correlaciones positivas en azul y las negativas en rojo. La intensidad de los colores responde a la intensidad de la correlación de Pearson. El orden de las variables responde a una agrupación jerárquica de clusters. TGs, triglicéridos; AGNEs, ácidos grasos no esterificados; PRT, proteínas totales; Lep, leptina; Adq, adiponectina; Ltrf, lactoferrina; Lys, lisozima; IgA, inmunoglobulina A; CAL, calcio; FOS, fósforo; SOD, sodio; POT, potasio; MAG, magnesio; AZU, azufre; CaP, ratio entre el calcio y el fósforo; NaK, ratio entre el sodio y el potasio; NAM, nicotinamida; NR, nicotinamida ribósido; NMN, nicotinamida mononucleótido; NIACINA = NAD + NAC + NR + NMN; EN, niacina total + equivalentes de niacina a partir del triptófano de acuerdo a la relación 60mg triptófano = 1mg niacina; ARNs, ácidos ribonucleicos de pequeño tamaño purificados; smallARNs, ácidos ribonucleicos entre 40-150 nucleótidos; microARNs,

ácidos ribonucleicos entre 4-40 nucleótidos. PAE, peso antes del embarazo; P1M, peso materno al mes de lactancia; IMC, índice de masa corporal materno promedio; GP, ganancia de peso durante el embarazo; EG, edad gestacional; PN, peso al nacer de la descendencia; zbmi24, z-scores para el IMC para la edad a los 24 meses; zwei6.0, velocidad de ganancia de peso entre el nacimiento y los 6 meses.

Así, **las correlaciones más intensas ($p < 0.001$) entre la ingesta y la composición de la leche materna** resultaron para la ingesta de vitamina D y beta-carotenos (PN1SS) como resultado de un patrón de consumo rico en lácteos, frutas y frutos secos pero pobre en cárnicos y cereales (PA1 + PA2), simultáneamente a la ingesta de vitaminas hidrosolubles, folatos, vitamina E e hierro procedentes de los suplementos (PN1) que implicó mayores niveles de AGMI de 16 a 22 carbonos y menores de los ácidos cáprico y láurico (PAG2) en la leche materna de las mujeres del estudio.

Así mismo, el perfil de ingesta rico en vitamina D y beta-carotenos (PN1SS) presentó una correlación positiva de menor intensidad pero igualmente significativa ($p < 0.05$) frente al perfil con niveles bajos de aminoácidos esenciales y ramificados, arginina y tirosina (PAa1) y negativa para los niveles de leptina y el perfil rico en Omega 6 y AGCM (PAG4).

Los dos perfiles de AG contemplados en este entramado (PAG2 y PAG4) correlacionaron a su vez positivamente con la ganancia de peso corporal durante el embarazo (PAG2-GP) y el peso materno antes del embarazo y el IMC materno durante la lactancia (PAG4-PAE e IMC).

Esta primera interconexión entre todas las partes del estudio muestra un esquema en el que el una ingesta menor de lácteos, frutas, frutos secos, suplementos multinutriente, vitamina D y beta-carotenos se observa en mujeres con mayor peso corporal materno en etapas perinatales, lo cual a su vez se asocia con menores niveles de AGMI pero mayores de AG Omega 6, AGCM, AaE, AaR, arginina, tirosina y leptina en la leche materna que producen.

Por lo tanto se podría plantear la ingesta de lácteos, frutas y frutos secos como una fuente de vitamina D y beta-carotenos con potencial modulador de la composición de la leche materna. Además, el efecto que tiene la ingesta de estos alimentos y nutrientes identificados sobre la leptina, los AG Omega 6, AGMI y AGCM son opuestos a los observados para el peso corporal materno, por lo que podría tratarse como una estrategia nutricional para la potencial prevención temprana de la obesidad a través de la modulación de la composición de la leche materna.

En relación al segundo perfil nutricional rico en vitamina C, beta-carotenos y fibra pero pobre en retinoides y vitamina D (PN2SS), observamos una correlación positiva frente al perfil pobre

en gamma-linolénico pero rico en hexadecenoico y EPA (PAG5), así como con los niveles de proteínas en leche materna ($p < 0.05$).

El patrón de consumo rico en cereales pero pobre en frutas y frutos secos (PA2) fue más habitual en mujeres con mayor peso corporal antes del embarazo, de menor edad y se relacionó con mayores niveles de TG, AGNEs y azufre en la leche materna.

En relación a las **correlaciones más intensas ($p < 0.001$) entre los distintos componentes de la leche materna** observamos correlaciones negativas entre el perfil pobre en AaE y AaR con los niveles de miR-181a, miR-103, let-7a y let-7b, mientras que ésta fue positiva entre el perfil pobre en ácido glutámico, asparagina, serina, glutamina y treonina con los niveles de miR-148a, miR-27a y let-7a.

Los niveles de TGs en leche materna correlacionaron positivamente con los niveles de microARNs en leche materna, los de proteínas con los de IgA, miR-181a, miR-103, miR-27b, miR-200b y miR-146b y la leptina con una lista extensa de los microARNs determinados (miR-181a, miR-103, miR-30a-5p, miR-27b, miR-200b, let-7a, miR-17, let-7b, let-7c y miR-146b).

Los niveles de lactoferrina correlacionaron positivamente con los de IgA y éstos con los de nicotinamida mononucleótido y smallARNs. Los niveles de calcio lo hicieron con los de magnesio, los de potasio con magnesio, sodio y azufre, y los de magnesio con el sodio y el azufre.

Por último observamos también una correlación positiva intensa entre los niveles de nicotinamida y las concentraciones de ARNs de pequeño tamaño, así como entre las cantidades relativas de todos los microARNs individuales determinados en el estudio consigo mismos.

En lo respectivo a las variables antropométricas y características maternas, las correlaciones positivas más intensas a destacar son las observadas para el IMC materno con los niveles de leptina, miR-222, miR-27a y let-7a, y la ingesta de isoleucina inversamente con la edad gestacional.

4.4.3 Potenciales mediadores nutrigenómicos de la predisposición a la obesidad durante la lactancia materna

Para contribuir a la evaluación de los efectos de la dieta y la composición de la leche materna sobre las trayectorias de crecimiento infantil y potenciales vías de mediación en la programación temprana de la obesidad, se planteó el estudio de seis análisis estadísticos mediante modelos lineales mixtos y de ecuaciones estructurales siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3.5.6.3.

Los modelos propuestos se seleccionaron como resultado de la observación de los factores nutricionales de la dieta materna con mayor asociación frente al IMC materno, variables de crecimiento infantil o de ciertos componentes de la leche materna y de las interrelaciones que presentaron a su vez todos los elementos entre sí.

Inicialmente, planteamos modelos longitudinales cuya variable explicada fuera el crecimiento infantil desde el nacimiento a los dos años y las variables explicatorias fueran un conjunto de factores dietéticos, antropométricos y de la composición de la leche materna, teniendo en cuenta simultáneamente las variables de confusión detectadas durante el transcurso del estudio como por ejemplo la estación del parto para los niveles de calcio en leche materna. Así, cada componente nutricional de la dieta (ingesta de isoleucina, vitamina D, fitoesteroles vegetales, almidón) o de la leche materna (niveles de sodio, ácido oleico, leptina, perfil de aminoácidos, glutamina, treonina, calcio, miR-27a y miR-27b) identificado se propone como potencial modulador de la predisposición a la obesidad de la descendencia durante la lactancia como resultado de la aplicación de modelos lineales mixtos en la población caracterizada.

A continuación se extrajo la información más relevante para construir los diagramas estructurales que reflejaran las vías de mediación más significativas. Es decir, se plantearon componentes de la leche materna concretos que tuvieran el potencial de mediar la transmisión intergeneracional de la obesidad materna durante la lactancia a la descendencia.

Finalmente, el análisis de ecuaciones estructurales nos ha permitido evaluar si los componentes de la leche identificados mediaron en cierta medida o no los efectos de la dieta materna, el IMC materno o la estación del parto sobre las variables antropométricas de la descendencia que nos permiten hipotetizar una menor o mayor predisposición a la obesidad de la descendencia.

4.4.3.1 La ingesta materna de isoleucina durante la lactancia

La isoleucina es un aminoácido ramificado esencial que se obtiene a través de la dieta mediante el consumo de alimentos proteicos de origen animal y vegetal (huevos, soja y derivados, pescado, lácteos y derivados, carnes y derivados y cereales).

Previamente se ha relacionado un aporte proteínico más elevado de las leches artificiales con la mayor predisposición al desarrollo de obesidad de la descendencia y se ha observado que ello podría venir mediado por un mayor contenido de aminoácidos ramificados, especialmente de leucina y también de glutamina en suero de lactantes, a través de su papel en la activación del centro coordinador de la adipogénesis que supone el complejo mTORC1 (144, 426).

Nuestros datos sugieren que la ingesta materna de isoleucina, procedente de un amplio abanico de alimentos proteicos, promueve en la descendencia una ganancia de peso más pronunciada durante los primeros seis meses de vida. Si bien, no sería consecuencia de un efecto directo sobre los niveles de aminoácidos ramificados o el contenido proteico de la leche que producen (de hecho, las correlaciones encontradas entre la ingesta de isoleucina y los niveles de aminoácidos en leche materna son negativas para los aminoácidos GLY, THR, ALA, LEU y VAL).

Los mecanismos que relacionan la ingesta proteica durante la lactancia con una mayor predisposición a la obesidad no están totalmente elucidados (58) y se trata por tanto de un área de investigación por explorar, en la que también se debería considerar no solo la fuente alimentaria sino también el contenido en aminoácidos.

En la cohorte estudiada, la ingesta de isoleucina en la dieta se asoció con mayores niveles de sodio en la leche materna (ver capítulo 4.4.1) además de influir positivamente sobre la velocidad de la ganancia de peso de la descendencia durante los primeros seis meses de vida. Así mismo, la edad gestacional y el peso materno también explicaron los niveles de sodio en la leche y éstos se relacionaron a su vez con la velocidad de crecimiento infantil (Figura 4.18).

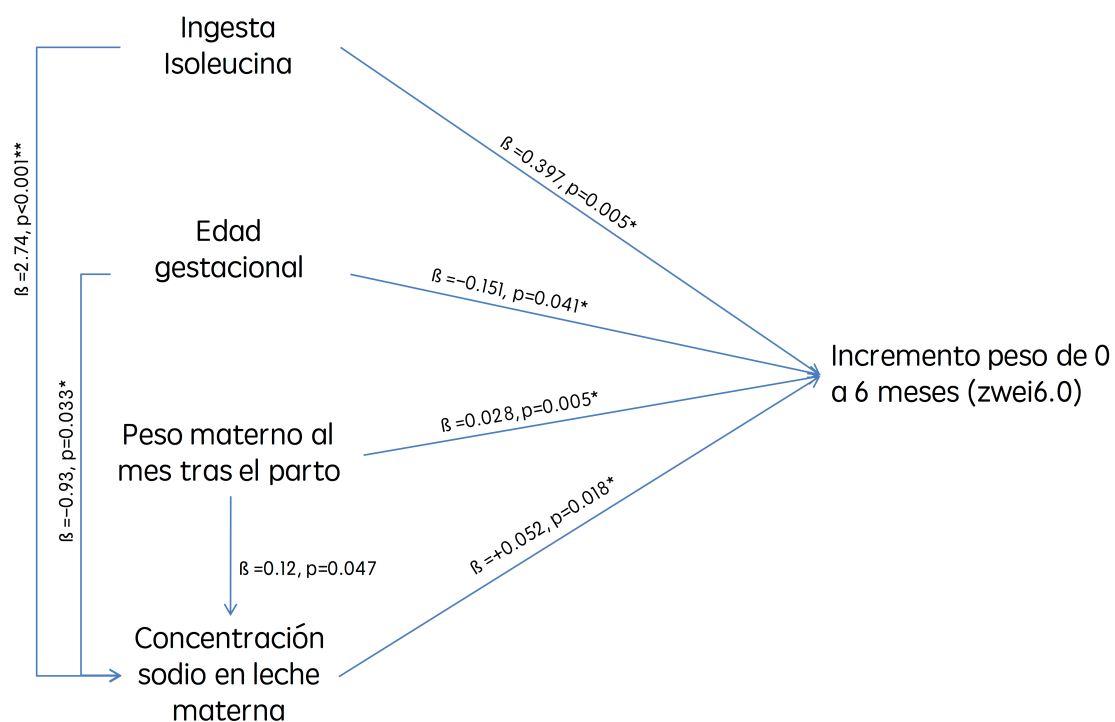


Figura 4.18 Esquema de las interrelaciones existentes entre la ingesta de isoleucina, la edad gestacional, el peso materno, las concentraciones de sodio en leche materna y el incremento de peso de 0 a 6 meses de la descendencia (zwei6.0). Se evaluó mediante modelos lineales entre pares de variables para cada uno de los cuales se presenta la pendiente y la significancia asociada (β , p). $^{**}p < 0.001$, $^*p < 0.05$

La ingesta de isoleucina también se correlacionó negativamente con los niveles de IgA (Figura 4.18). La IgA es una proteína de refuerzo del sistema inmunitario gastrointestinal inmaduro del recién nacido, que mejora la defensa frente a infecciones del lactante y que está presente en altos niveles en leche materna, especialmente en calostro (111). En una revisión sistemática se ha propuesto que su acción a través de la modificación de los niveles de antígenos que se filtran al hígado y páncreas podría contribuir a asignar un papel modulador de la IgA sobre la programación metabólica temprana (112). Los niveles de IgA séricos y en calostro de mujeres lactantes con sobrepeso u obesidad se han descrito superiores en comparación con mujeres normopeso (361). También se ha descrito que la población infantil con sobrepeso y un perfil metabólico más desfavorable (resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia y niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad) presenta niveles séricos de IgA más altos (427), por lo que esta proteína bioactiva parece ser de interés en el estudio de la programación temprana de la obesidad, aunque nuestros resultados no apuntan a un efecto directo, sino en relación con el aporte de isoleucina de la dieta materna.

El modelo lineal que incluyó todas las variables que explicaron el crecimiento infantil de forma independiente identificó solamente el peso materno con un efecto significativo ($\beta=0.025$, $p=0.013$). Con este resultado, se planteó un análisis de mediación para el sodio del efecto del peso materno sobre la ganancia de peso corporal de la descendencia, que no alcanzó la significancia estadística (Figura 4.19).

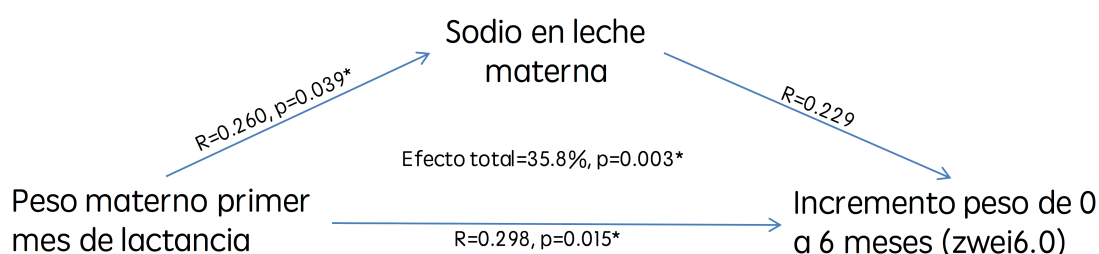


Figura 4.19 Esquema de mediación del efecto del peso materno sobre la velocidad en la ganancia de peso de la descendencia de 0 a 6 meses de edad para los niveles de sodio en leche materna. Se presenta la intensidad del efecto estandarizado en el contexto del modelo (R), las significancias asociadas (p) y el porcentaje de la variable explicada total debido al conjunto de variables contempladas en el modelo. N=59; Índice comparativo = 1.000; Estadístico SRMR = 0.000. ** $p<0.001$, * $p<0.05$

El análisis de mediación del sodio para la ingesta de isoleucina sobre la ganancia de peso corporal de la descendencia tampoco obtuvo la significancia estadística (datos no mostrados).

Previamente, la concentración de sodio en leche no se ha asociado con la evolución del peso corporal de la descendencia (394), sin embargo, una mayor ingesta de sodio durante la lactancia podría estar relacionado, tal y como se ha descrito en algunos estudios durante el embarazo (306, 308, 428), con una mayor sensibilidad frente al desarrollo de hipertensión en la edad adulta y contribuir así en los casos de síndrome metabólico.

De hecho, recientemente se ha revisado el papel de este mineral frente al desarrollo de enfermedades no transmisibles en población infantil, apoyando una limitación de su consumo al promover la hipertensión y consecuentemente el riesgo cardiovascular (30).

4.4.3.2 El ácido oleico de la leche materna

Los niveles de ácido oleico en leche materna fueron significativamente menores a mayor IMC materno, independientemente de la ingesta de este ácido graso. Además, la ingesta de fitoesteroles se asoció con mayores niveles de ácido oleico en leche materna, por lo que la ingesta materna de fitoesteroles podría contrarrestar el impacto del IMC materno sobre los niveles de ácido oleico. A su vez, el IMC materno explicó trayectorias de crecimiento infantil de 0 a 2 años más pronunciadas para los IMC ajustados por sexo (z_{bmi}) de la población infantil. Así lo hizo también el peso al nacer, que mostró la correlación más intensa sobre la evolución de los IMC de la descendencia (Figura 4.20).

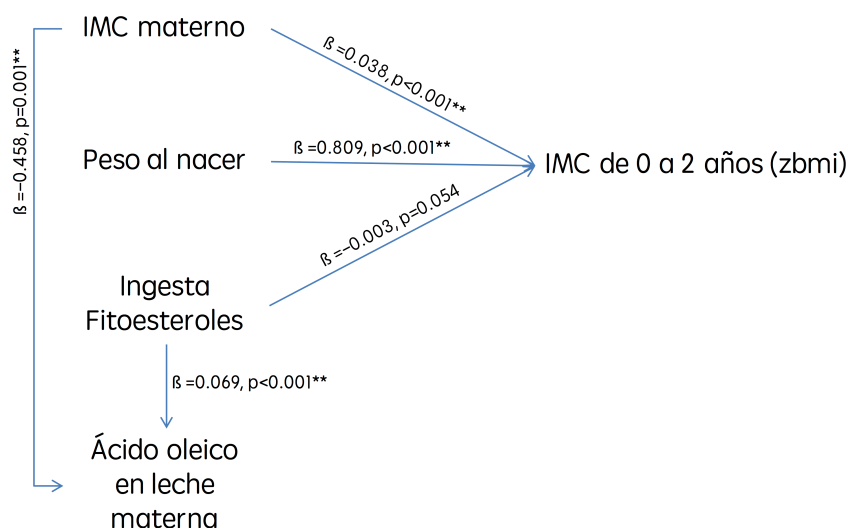


Figura 4.20 Esquema de las interrelaciones existentes entre la ingesta de fitoesteroles, el IMC materno, el peso al nacer y las concentraciones de ácido oleico en leche materna y la trayectoria de crecimiento infantil de 0 a 2 años en base al IMC ajustado por sexo (z_{bmi}). Se evaluó mediante modelos lineales entre pares de variables para cada uno de los cuales se presenta la pendiente y la significancia asociada (β , p). **p<0.001, *p<0.05

Cuando incluimos en el modelo lineal longitudinal mixto todas las variables, tan solo el IMC materno ($\beta = 0.041$, $p < 0.001$) y el peso al nacer ($\beta = 0.816$, $p < 0.001$) mantuvieron un efecto significativo sobre la variable explicada. Este resultado indica que estas dos variables tienen mucho peso en la evolución de los IMC de la descendencia de 0 a 2 años y que los efectos aislados del resto de variables podrían ser muy sutiles, quedando por tanto enmascarados al ajustar el modelo. Por ello y basándonos en la asociación negativa entre el IMC materno y los niveles de ácido oleico en leche materna independiente de su ingesta a través de la dieta, planteamos un análisis de mediación para este ácido graso del efecto que tiene el IMC materno sobre el IMC ajustado por sexo al año de edad de la descendencia (zbmi12) (Figura 4.21).

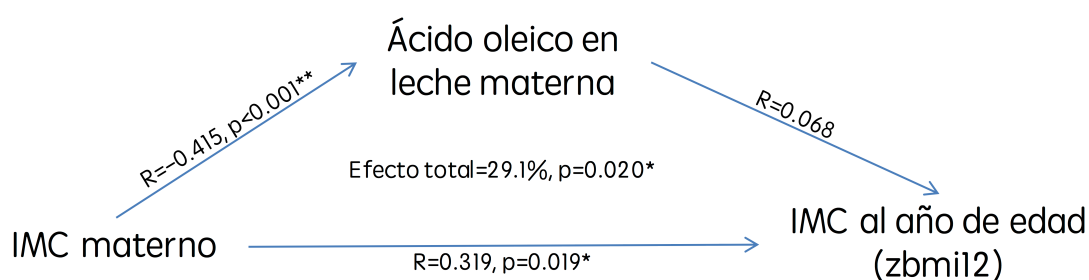


Figura 4.21 Esquema de mediación del efecto del IMC materno sobre el IMC al año de edad (zbmi12) para los niveles de ácido oleico en leche materna. Se presenta la intensidad del efecto estandarizado en el contexto del modelo (R), las significancias asociadas (p) y el porcentaje de la variable explicada total debido al conjunto de variables contempladas en el modelo. N=59; Índice comparativo = 1.000; Estadístico SRMR = 0.000. ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$

El análisis de mediación no obtuvo confirmación para tal hipótesis, aunque el efecto total de explicación del IMC de la descendencia a partir del IMC materno y los niveles de ácido oleico en la leche materna fue significativo y de un 29.1%.

En cualquier caso, los efectos observados en relación al IMC materno y los niveles de ácido oleico en leche, de forma independiente de su ingesta son novedosos y permiten sugerir que este AG es una molécula potencialmente bioactiva en la programación temprana de la obesidad durante la lactancia materna. De hecho, nuestro laboratorio propuso recientemente un papel en la reconversión de las células adiposas blancas en tejido marrón termogénicamente más activo, para el ácido oleico de la leche materna en animales de experimentación (429). En dicho estudio, la ingesta materna de ácido oleico se traduce en una mayor concentración en leche y ello correlaciona negativamente con la ganancia de peso corporal de la descendencia.

Nuestros resultados en población humana no muestran correlación entre la ingesta de oleico y sus niveles en leche materna, seguramente debido a la complejidad de factores interrelacionados que pueden influir, además de tratarse de un estudio observacional por contraposición a una intervención con suplementación de ácido oleico. En cuanto a la relación frente a la ganancia de peso de la descendencia, tampoco obtuvimos una correlación significativa para este ácido graso, seguramente influenciado por el fuerte efecto que tiene el IMC materno sobre sus niveles en la leche humana, factor que no está considerado en el estudio al que nos hemos referido, ya que se trata de experimentación animal.

El conjunto de evidencias pone de manifiesto el interés de llevar a cabo un estudio más detallado para evaluar el papel protector que podría jugar el ácido oleico en la leche materna sobre la susceptibilidad a la obesidad de la descendencia, ya que cuando sus niveles son bajos como ocurre en leche de mujeres con sobrepeso y obesidad, podría desfavorecer la programación de un peso adecuado en la descendencia.

4.4.3.3 La leptina en la leche materna

Los niveles de leptina en leche materna fueron explicados de forma significativa por el IMC materno tal y como se ha descrito previamente (31). En este estudio, observamos que además su concentración en leche se asocia positivamente con la ingesta de almidón durante la lactancia y negativamente con la de fitoesteroles. A su vez, todas las variables (IMC materno, ingesta de fitoesteroles, ingesta de almidón y niveles de leptina en leche materna) explicaron independientemente la trayectoria de crecimiento infantil de 0 a 2 años de la descendencia, con un efecto promotor del IMC de la descendencia para todos los casos con excepción de la ingesta de fitoesteroles (Figura 4.22).

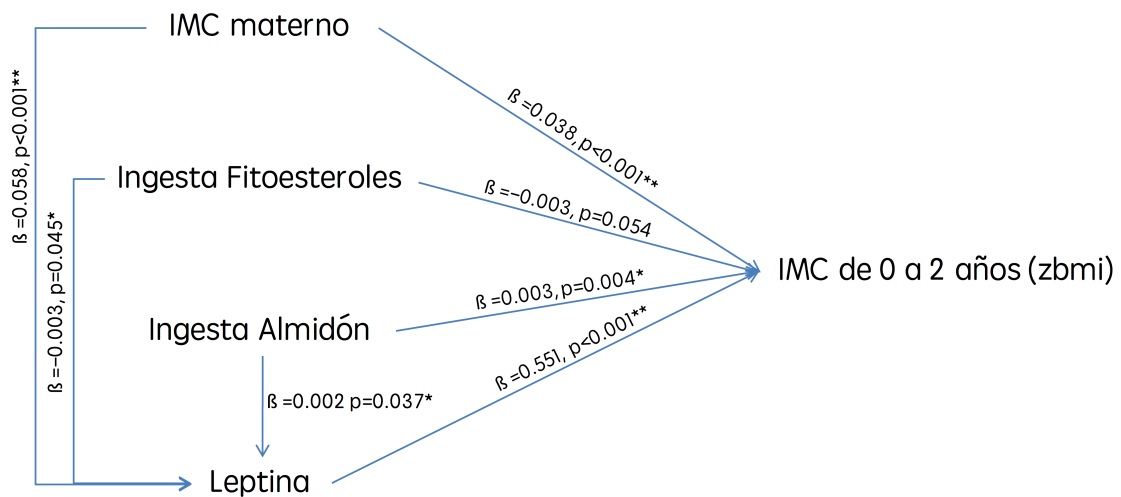


Figura 4.22 Esquema de las interrelaciones existentes entre la ingesta de almidón, fitoesteroles, el IMC materno, las concentraciones de leptina en leche materna y la trayectoria de crecimiento infantil de 0 a 2 años en base al IMC ajustado por sexo (zBMI). Se evaluó mediante modelos lineales entre pares de variables para cada uno de los cuales se presenta la pendiente y la significancia asociada (β , p). $^{**}p < 0.001$, $^*p < 0.05$

Cuando todas las variables se incluyeron en un único modelo lineal mixto longitudinal, tan solo la ingesta de almidón mantuvo un efecto significativo sobre el crecimiento infantil ($\beta = 0.002$, $p = 0.044$). Esta observación pone de manifiesto que un factor dietético como es el aporte de almidón en la dieta materna durante la lactancia, podría tener un papel igual o mayor que el otorgado al IMC materno y/o los niveles de leptina en leche materna en la determinación del crecimiento infantil durante los primeros dos años de vida de la descendencia.

A continuación planteamos un análisis de mediación del efecto del IMC materno sobre la velocidad en la ganancia de peso de 0 a 6 meses de la descendencia para la leptina, ya que este trinomio de variables recibieron las asociaciones más significativas mediante los modelos lineales pareados (Figura 4.23).

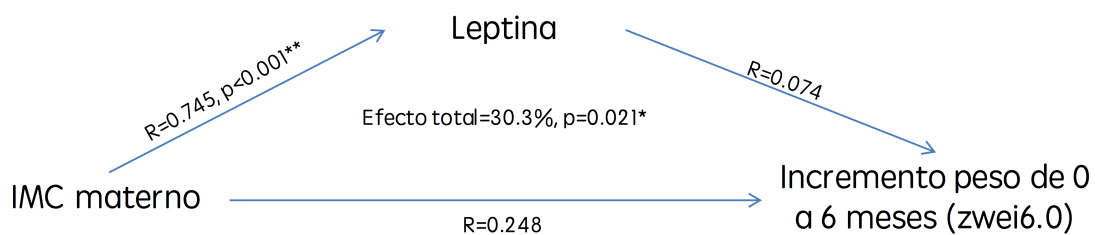


Figura 4.23 Esquema de mediación del efecto del IMC materno sobre la velocidad en la ganancia de peso de la descendencia de 0 a 6 meses de edad para los niveles de leptina en leche materna. Se presenta la

intensidad del efecto estandarizado en el contexto del modelo (R), las significancias asociadas (p) y el porcentaje de la variable explicada total debido al conjunto de variables contempladas en el modelo. N=53; Índice comparativo = 1.000; Estadístico SRMR = 0.000. **p<0.001, *p<0.05

En la Figura 4.23 podemos observar que los niveles de leptina en leche materna son altamente explicados por el IMC materno, sin embargo, no obtuvimos confirmación para su potencial papel mediador del efecto del IMC materno sobre el incremento de peso de 0 a 6 meses de la descendencia. Aun así, el efecto total del modelo fue significativo y explicó en un 30.3% el crecimiento infantil.

Por un lado creemos que con un tamaño muestral mayor, así como la segmentación de la población en mujeres normopeso y por otro lado las que tienen sobrepeso u obesidad durante la lactancia, son dos aproximaciones recomendadas para próximos estudios derivados de este piloto que permitirán esclarecer el papel de la leptina durante la lactancia materna en relación a la programación temprana de la obesidad.

En este estudio hemos planteado un análisis de mediación para la leptina en leche materna, del efecto que tiene el IMC materno sobre la ganancia de peso corporal de la descendencia, modelo que nos parece idóneo para su aplicación en diseños experimentales de este tipo.

También hemos descrito un conjunto de interrelaciones entre componentes concretos de la dieta (almidón y fitoesteroles) que explican diferentes trayectorias de los IMC de la descendencia durante los primeros dos años de vida, lo cual abre una puerta de investigación sobre los componentes concretos de la dieta materna con potencial modulador en la programación temprana de la obesidad, así como los componentes de la leche que podrían mediar dicho efecto, en este caso la leptina.

4.4.3.4 El perfil de aminoácidos de la leche materna

El perfil de aminoácidos de la leche materna fue distinto entre mujeres con normopeso y las que presentaron sobrepeso u obesidad durante la lactancia. La observación más relevante derivada de los resultados previamente descritos hace referencia a un perfil pobre en ácido glutámico, glutamina, serina, asparagina y treonina en la leche de mujeres con sobrepeso u obesidad. Además este mismo perfil presentó una tendencia hacia la promoción de una velocidad más rápida en la ganancia de peso corporal de la descendencia, que fue significativa para los niveles individuales de ácido glutámico y treonina.

A raíz de las observaciones descritas, planteamos un análisis de mediación para las tres variables identificadas con potencial papel mediador del efecto del IMC materno sobre la velocidad de la ganancia de peso corporal de la descendencia de 0 a 6 meses: el perfil de aminoácidos pobre en ácido glutámico, glutamina, serina, asparagina y treonina (PAa2), las concentraciones de ácido glutámico y las de treonina a nivel individual.

En primer lugar obtuvimos un efecto significativo del IMC materno sobre el perfil PAa2, lo que confirma las observaciones previas. Sin embargo, el análisis del potencial papel mediador no obtuvo la significancia estadística (Figura 4.24).

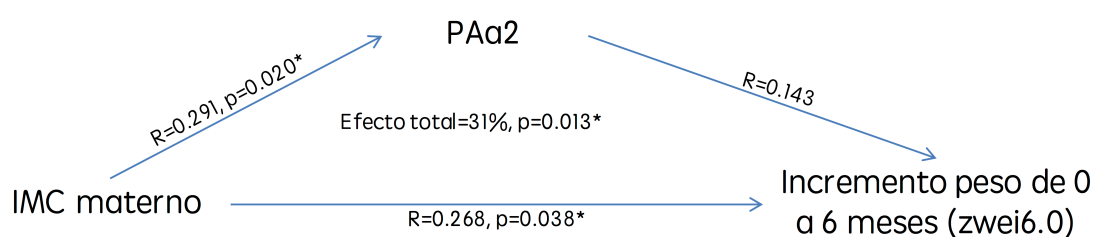


Figura 4.24 Esquema de mediación del efecto del IMC materno sobre la velocidad en la ganancia de peso de la descendencia de 0 a 6 meses de edad (zwei6.0) para el perfil de aminoácidos pobre en ácido glutámico, glutamina, serina, asparagina y treonina en leche materna. Se presenta la intensidad del efecto estandarizado en el contexto del modelo (R), las significancias asociadas (p) y el porcentaje de la variable explicada total debido al conjunto de variables contempladas en el modelo. N=58; Índice comparativo = 1.000; Estadístico SRMR = 0.000. **p<0.001, *p<0.05

El esquema dibujado en la figura 4.24 presenta una situación en la que la leche de mujeres con sobrepeso u obesidad es más pobre en ácido glutámico, glutamina, serina, asparagina y treonina y ello podría favorecer el incremento de peso de la descendencia durante los primeros seis meses de vida mediante mecanismos aún desconocidos.

Aunque no obtenemos significancia estadística para el papel mediador del perfil de aminoácidos descrito, el efecto total de ambas variables (IMC materno y el perfil de Aa) explicatorias del crecimiento infantil fue del 31%, por lo que tienen un potencial papel modulador de la programación temprana de la obesidad.

Las concentraciones de ácido glutámico en leche materna presentaron en el contexto del modelo de mediación un efecto inverso sobre la velocidad de la ganancia de peso de la descendencia de 0 a 6 meses de edad (Figuras 4.25), tal y como habíamos también observado en el estudio de correlaciones, mientras que para la treonina no se alcanzó la significancia estadística para esta misma asociación inversa en el contexto del análisis de mediación (Figura 4.26).

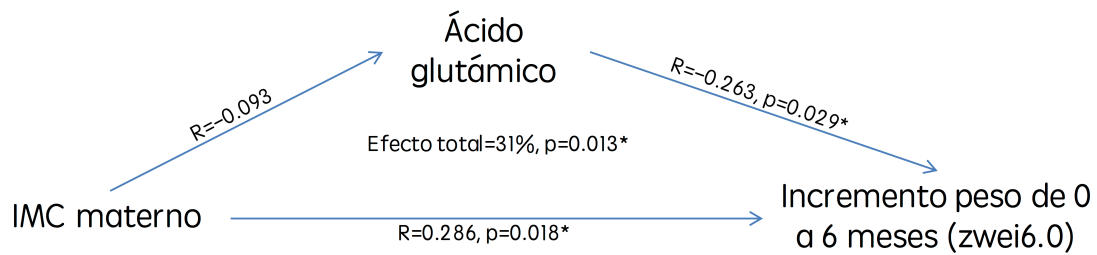


Figura 4.25 Esquema de mediación del efecto del IMC materno sobre la velocidad en la ganancia de peso de la descendencia de 0 a 6 meses de edad (zwei6.0) para los niveles de ácido glutámico en leche materna. Se presenta la intensidad del efecto estandarizado en el contexto del modelo (R), las significancias asociadas (p) y el porcentaje de la variable explicada total debido al conjunto de variables contempladas en el modelo. N=58; Índice comparativo = 1.000; Estadístico SRMR = 0.000. **p<0.001, *p<0.05

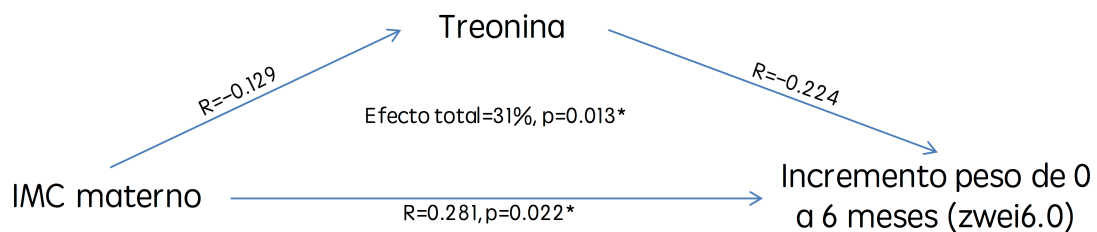


Figura 4.26 Esquema de mediación del efecto del IMC materno sobre la velocidad en la ganancia de peso de la descendencia de 0 a 6 meses de edad (zwei6.0) para los niveles de treonina en leche materna. Se presenta la intensidad del efecto estandarizado en el contexto del modelo (R), las significancias asociadas (p) y el porcentaje de la variable explicada total debido al conjunto de variables contempladas en el modelo. N=58; Índice comparativo = 1.000; Estadístico SRMR = 0.000. **p<0.001, *p<0.05

A pesar de no obtener significancia en los modelos de mediación, los resultados son un buen punto de partida para el planteamiento de nuevos diseños experimentales hacia la identificación de perfiles de aminoácidos como huella de la impronta metabólica que supone la obesidad materna durante la lactancia, así como aminoácidos implicados en la regulación del crecimiento infantil, especialmente en lo relacionado con la acumulación de masa grasa y la regulación de la saciedad durante la lactancia.

En definitiva, nuestros resultados apuntan a que las mujeres con sobrepeso u obesidad sintetizan leche con menor contenido en ácido glutámico y treonina, ambos aminoácidos con un potencial efecto protector sobre la ganancia de peso corporal en la descendencia durante la lactancia.

4.4.3.5 El calcio de la leche materna

Los niveles de calcio en leche materna fueron significativamente inferiores cuando el parto tuvo lugar en Invierno-Primavera frente a la etapa de Verano-Otoño tal y como hemos visto en el capítulo 4.3.3, independientemente de la ingesta de este mineral en la dieta materna. Tanto la estación del parto, como la concentración láctea de calcio explicaron significativamente la trayectoria de crecimiento infantil de 0 a 2 años en base al IMC estandarizado, de forma que mayores niveles de calcio en leche materna obtenidos en partos durante los meses de Verano-Otoño tuvieron se asociaron con menores IMC en la descendencia hasta los dos años de edad. Por el contrario, la ingesta materna de vitamina D se asoció positivamente con la evolución del crecimiento infantil y no presentó asociaciones con los niveles de calcio en leche materna (Figura 4.27).

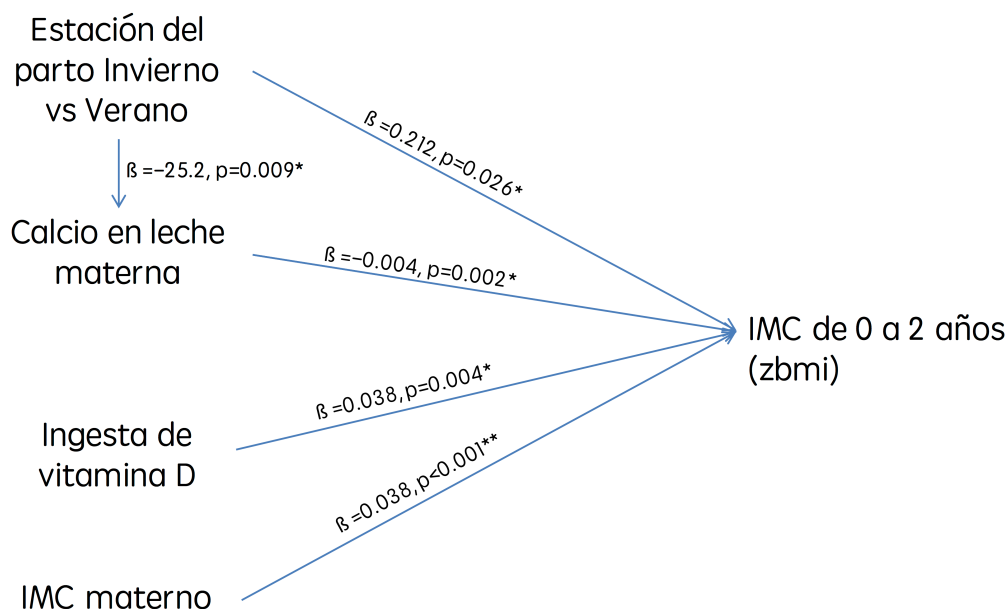


Figura 4.27 Esquema de las interrelaciones existentes entre la ingesta de vitamina D, el IMC materno, la estación del parto y las concentraciones de calcio en leche materna y la trayectoria de crecimiento infantil de 0 a 2 años en base al IMC ajustado por sexo (zbmi). Se evaluó mediante modelos lineales entre pares de variables para cada uno de los cuales se presenta la pendiente y la significancia asociada (β , p). ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$

Cuando incluimos en el modelo lineal todas las variables, el IMC materno ($\beta = 0.039$, $p < 0.001$), la ingesta de vitamina D ($\beta = 0.043$, $p = 0.001$) y los niveles de calcio en leche materna ($\beta = -0.003$, $p = 0.020$) mantuvieron un efecto significativo sobre la variable explicada. Esta observación nos hizo pensar en el calcio como un potencial mediador del efecto de la estación del parto sobre la trayectoria de los IMC de la población infantil (Figura 4.28).

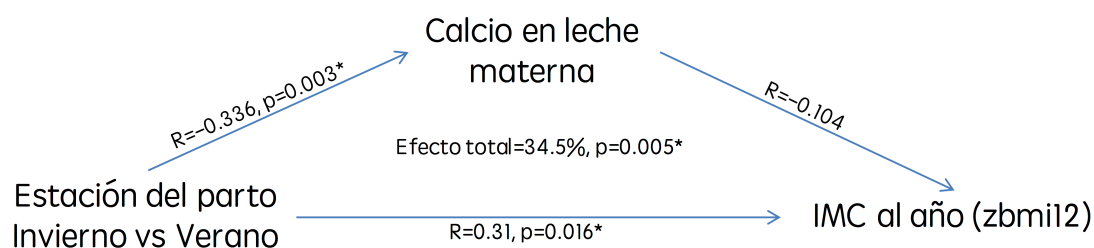


Figura 4.28 Esquema de mediación del efecto de la estación del parto sobre el IMC al año de edad (zBMI12) para los niveles de calcio en leche materna. Se presenta la intensidad del efecto estandarizado en el contexto del modelo (R), las significancias asociadas (p) y el porcentaje de la variable explicada total debido al conjunto de variables contempladas en el modelo. N=59; Índice comparativo = 1.000; Estadístico SRMR = 0.000. **p<0.001, *p<0.05

Los resultados obtenidos apuntan a que los niveles de calcio en leche materna explican junto con la estación en la que tiene lugar el parto, el IMC de la descendencia al año de edad en un 34.5%, con un potencial rol protector a mayores niveles en leche frente a la programación temprana de la obesidad.

El calcio es un mineral en investigación por sus efectos en la reducción de la acumulación de masa grasa en tejido adiposo y que supone una de las líneas de investigación actuales de nuestro laboratorio, donde se ha caracterizado su potencial mecanismo de acción en modelos animales de obesidad (430-435). Aun así, su implicación en la prevención de enfermedades cardiovasculares, entre las cuales encontramos la obesidad, requiere de más estudios para poder alcanzar resultados concluyentes (274). Sin embargo, el consumo de yogur y productos lácteos, reconocidas fuentes de calcio en la dieta, sí está más avalado en este sentido incluso por estudios randomizados (436).

De momento, aunque el estatus global de este mineral es deficitario en las sociedades occidentales tal y como hemos descrito para la población estudiada, y a pesar de que sus requerimientos están incrementados durante las etapas perinatales, la suplementación no ha mostrado beneficios que la sustenten y de hecho en algún caso, se ha identificado un mayor peso al nacer, cuya repercusión clínica aún no está esclarecida (437).

De hecho, nuestros resultados no mostraron una correlación entre la ingesta de calcio y sus niveles en leche materna, ni tampoco frente a la de vitamina D encargada de su absorción a nivel intestinal y de regular el metabolismo osteocálcico, sino que las concentraciones de calcio respondieron ante la estación en la que tuvo lugar el parto, lo cual debe venir de la mano del estatus en vitamina D asociado a la exposición solar exclusivamente.

Recientemente se le ha atribuido a esta vitamina un papel en el desarrollo del sistema inmune, tanto innato como adaptativo, modulado durante la lactancia materna (57). En nuestro país el sol se encarga de activar la síntesis endógena de la vitamina D en cantidades suficientes (si no es invierno), sin embargo, el estatus nutricional se ha identificado como insuficiente en la población española, especialmente en mujeres. Además, en periodo de lactancia los requerimientos de esta vitamina al igual que los del calcio se ven incrementados (438), por lo que en la actualidad se está recomendando la suplementación dietaria con esta vitamina tanto a las madres como a los bebés.

Nuestros resultados presentan una relación promotora de la obesidad infantil para la ingesta materna de vitamina D durante la lactancia procedente de la ingesta más la suplementación recibida en algunos casos, por lo que su suplementación de momento debería evitarse hasta tener suficiente evidencia científica y recomendar en todo caso la exposición solar diaria tanto para la madre durante la etapa perinatal como para el bebé durante la lactancia materna. De hecho, el Instituto de Medicina Americano hace mención en su último comunicado sobre recomendaciones de calcio y vitamina D a que tanto una deficiencia como un exceso podrían ser perjudiciales, incrementando el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares o el cáncer de páncreas (276).

En cualquier caso, tanto el calcio como la vitamina D son nutrientes recientemente relacionados con parámetros metabólicos que por tanto requieren de una especial atención en todas las etapas de la vida y más concretamente durante la lactancia materna, de acuerdo a nuestros resultados.

4.4.3.6 Los niveles de miR-27a y miR27b en la leche materna

Los niveles de miR-27a y miR-27b correlacionaron significativamente con el IMC materno y con la velocidad de la ganancia de peso de 0 a 6 meses de la descendencia tal y como se ha descrito en el capítulo 4.3.5. Por ello, planteamos directamente dos análisis de mediación para estos microARNs (Figuras 4.29 y 4.30).

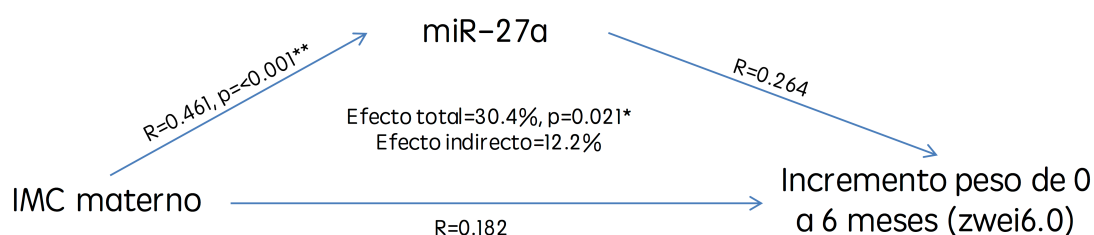


Figura 4.29 Esquema de mediación del efecto del IMC materno sobre la velocidad en la ganancia de peso de la descendencia de 0 a 6 meses de edad para los niveles de miR-27a en leche materna. Se presenta la

intensidad del efecto estandarizado en el contexto del modelo (R), las significancias asociadas (p) y el porcentaje de la variable explicada total debido al conjunto de variables contempladas en el modelo. N=52; Índice comparativo = 1.000; Estadístico SRMR = 0.000. **p<0.001, *p<0.05

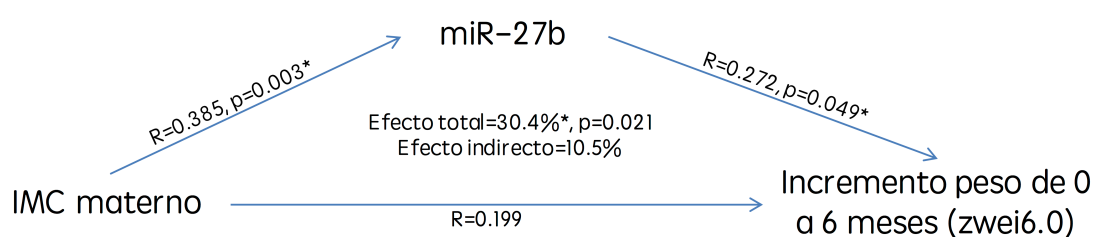


Figura 4.30 Esquema de mediación del efecto del IMC materno sobre la velocidad en la ganancia de peso de la descendencia de 0 a 6 meses de edad para los niveles de miR-27b en leche materna. Se presenta la intensidad del efecto estandarizado en el contexto del modelo (R), las significancias asociadas (p) y el porcentaje de la variable explicada total debido al conjunto de variables contempladas en el modelo. N=52; Índice comparativo = 1.000; Estadístico SRMR = 0.000. **p<0.001, *p<0.05

Así, observamos que para ninguno de los microARNs analizados se obtuvo la significancia estadística suficiente para el efecto mediador o indirecto (12.2% y 10.5% respectivamente), aunque los datos apuntan a que con un tamaño muestral superior, el efecto sí obtuviera la potencia suficiente, por lo que proponemos a estos dos microARNs como potenciales mediadores de la transmisión epigenética de la obesidad materna a su descendencia a través de la leche materna.

Estos dos microARNs se han descrito previamente como reguladores negativos de la adipogénesis o la diferenciación de los pre-adipocitos a través de la supresión del factor de transcripción PPARgamma encargado de su promoción en tejido adiposo (439, 440). En hígado, el efecto negativo de ambos se ha identificado sobre el factor PPARalfa, lo cual se traduciría en una reducción de la beta-oxidación de ácidos grasos mediada por este receptor. Es decir, mayores niveles de los miR-27 favorecen la acumulación de lípidos a nivel hepático mientras que en tejido adiposo frenan la adipogénesis, especialmente la diferenciación de los pre-adipocitos marrones en tejido adiposo marrón (422).

Sin embargo, las funciones de los microARNs son específicas del tejido en el cual actúan y por tanto también difieren de los microARNs circulantes que se encuentran en los distintos fluidos corporales, tal y como es la leche materna. Las funciones en estos compartimentos son todavía ampliamente desconocidas (441), por lo que nuestros resultados arrojan algo de luz a una

potencial función mediadora de la transmisión inter-generacional de la obesidad materna a la descendencia y plantean a este grupo de microARNs como biomarcadores de tal efecto así como interesantes dianas epigenéticas sobre las que investigar su modulación para romper el círculo vicioso que supone la perpetuación perinatal de la obesidad.

5. Recapitulación

La **cohorte de madres lactantes** residentes en Mallorca caracterizada en este estudio tenía 32 años de edad en promedio, ha sido mayoritariamente de etnia blanca (89.8%), ha dado a luz a término (83.1%) y en los meses de Invierno-Primavera (64.4%) y ha seguido lactancia exclusiva (77.9-86.4%) a lo largo de los 3 meses estudiados. El 35.6% de madres lactantes tenía **sobrepeso u obesidad durante la lactancia (IMC \geq 25kg/m²)**, las cuales presentaron una mayor prevalencia de partos por cesárea (33.3% vs 7.9%) y lactancias mixtas (28.6% vs 5.3%), así como han dado a luz bebés que han seguido una velocidad en la ganancia de peso corporal (zwei6-0) más rápida durante los primeros seis meses de vida (1.01 vs 0.61).

La descendencia, analizada según los estándares de crecimiento de la OMS, ha presentado un crecimiento situado entre ± 1 desviación estándar (DE) para los z-scores del peso para la edad, el PC para la edad, el IMC para la edad y el peso para la talla de 0 a 2 años. Si bien se identificó un **61.0% de la población infantil en riesgo de sobrepeso y un 8.5% en situación de sobrepeso**, lo cual refleja la situación alarmante de prevalencia de sobrepeso infantil que sufre nuestra sociedad actual, incluso en etapas tan tempranas de 0 a 2 años.

En la población infantil de madres con sobrepeso u obesidad se observó una **trayectoria de crecimiento diferencial** entre sexos respecto de la de madres normopeso. En concreto, los niños presentaron variables antropométricas superiores mientras que las niñas fueron más pequeñas que sus respectivos controles de madres con IMC $<$ 25kg/m². Esta diferencia en la trayectoria del crecimiento infantil fue significativa especialmente al evaluar el peso corporal, de 0 a 2 años, que fue a su vez explicada por la edad gestacional, ser o no primípara y la estación del nacimiento además del IMC materno y el sexo del lactante. De hecho, **la edad gestacional y el peso al nacer, variables asociadas al IMC materno**, tuvieron gran relevancia en el transcurso del crecimiento infantil de 0 a 2 años de edad.

La **valoración de la dieta materna durante la etapa de lactancia** reveló un estatus nutricional similar al descrito para la población española general (1) caracterizada por una ingesta de proteínas por encima de los requerimientos medios estimados (86.2g/día vs 71.5g/día), una contribución calórica de la grasa muy elevada (43.9% vs 30-35%) en detrimento de la fracción de carbohidratos (39.8% vs 50-60%) y porcentajes por encima de los recomendados para la ingesta de ácidos grasos saturados (AGS) (13.8% vs 7-8%). Además la ingesta de fibra dietética también fue insuficiente tal y como se ha descrito para la población española general (20.7g/día vs 25g/día).

Sin embargo, en comparación con las ingestas observadas específicas para las mujeres españolas entre 25 y 44 años (184), se observó una mejor distribución de la contribución de los

azúcares sencillos (16.5% vs 20%) y de ácidos grasos insaturados (19.9% vs 18%) respecto del total calórico ingerido. Además, el porcentaje de la población con adherencias intermedias y altas a una dieta mediterránea fue superior al descrito para mujeres españolas (MDS2, 62.8% vs 38%).

El estatus de **hidratación** se estimó adecuado al estado fisiológico de lactancia, aunque se identificaron algunos casos con un consumo de hasta 2g/día de alcohol que podrían indicar situaciones desfavorables sobre la salud del lactante.

La **valoración de la ingesta de micronutrientes** mostró un cierto riesgo por deficiencia en la ingesta de vitaminas B9 (59.3% de la cohorte de madres lactantes estudiada), D (94.9%) y E (81.4%) y en los minerales calcio (76.3%), zinc (86.4%) y yodo (62.7%) al no alcanzar el 80% de la población las ingestas recomendadas en cada caso; así como riesgo por exceso al superar los límites de ingesta máxima permitidos para la vitamina B3 (54.2%) y el sodio (37.3%) de acuerdo a la etapa fisiológica de lactancia.

En relación a la **suplementación con complejos multinutriente**, donde un 57.6% recibió algún suplemento durante la lactancia, se identificaron situaciones cuya valoración del estatus nutricional no justifica la suplementación que recibieron, y al contrario, casos con un estatus de micronutrientes insuficiente que justifica una suplementación que no recibieron. Esto pone en evidencia una cierta arbitrariedad en este tipo de intervención nutricional que debería responder y ajustarse a necesidades justificadas y efectuarse tras una previa valoración del estatus nutricional.

En relación a la calidad de la dieta y sus características generales, se identificaron dos **patrones de ingesta de nutrientes y alimentos** que explicaron la mayor parte de la varianza muestral en la población estudiada: un perfil rico en vitaminas del grupo B y especialmente en ingesta de ácido fólico y vitamina D, y un patrón de ingesta rico en lácteos y derivados pero relativamente pobre en productos cárnicos. El perfil rico en vitaminas respondió a la suplementación recibida, por lo que se identifica ésta como un factor relevante de la variabilidad muestral en cuanto a la ingesta de nutrientes.

Asociado al **IMC materno**, se observó una ingesta calórica superior de AGMI (21.4% vs 19.0%), AGPI Omega 6 (2.13% vs 1.55%) y Omega 3 (0.17% vs 0.13%) pero menor de azúcares (14.4% vs 17.6%) en mujeres con sobrepeso u obesidad en relación con la presentada en mujeres normopeso. La ingesta de azúcares totales (75.4g/día vs 94.9g/día) y concretamente de glucosa (7.8g/día vs 10.6g/día), fructosa (9.4g/día vs 12.6g/día) y sacarosa (20.7g/día vs 29.5g/día) fue inferior en mujeres con sobrepeso u obesidad durante la lactancia. Así mismo, la ingesta total de fitoesteroles vegetales (36.6mg/día vs 61.4mg/día) fue menor en este grupo y se

relacionó con menores ingestas de beta-sitosterol (21mg/día vs 35.5mg/día), estigmasterol (4.48mg/día vs 6.19mg/día) y campesterol (2.53mg/día vs 4.15mg/día).

Por otro lado, la suplementación con micronutrientes recibida se tradujo en una ingesta total (alimentos más suplementos) menor de vitaminas C (111mg/día vs 158mg/día) y E (9.62mg/día vs 12.2mg/día) y hierro (27.3mg/día vs 42mg/día) pero mayor de cloro (2323mg/día vs 2016mg/día) en mujeres con sobrepeso durante la lactancia. Además observamos un perfil vitamínico más pobre en la obesidad, aunque sin obtener diferencias significativas para las ingestas de tiamina (1.6mg/día vs 1.76mg/día), riboflavina (1.99mg/día vs 2.34mg/día), vitamina B6 (2.41mg/día vs 2.75mg/día), ácido fólico (374mg/día vs 446mg/día), vitamina B12 (5.42mg/día vs 6.56mg/día) y vitamina D (2.67mg/día vs 3.89mg/día).

Tras la caracterización de la cohorte estudiada y la valoración nutricional del estatus materno, se ha caracterizado la concentración de bioactivos de interés en leche materna de acuerdo a los objetivos propuestos en esta tesis. A continuación se comentan los cambios evolutivos más significativos asociados a los tres meses de lactancia y el análisis de los factores que presentan una concentración en leche materna que se relaciona significativamente con el grado de obesidad materno.

La **composición de la leche materna a lo largo de los tres primeros meses de lactancia** fue bastante estable para los componentes analizados a excepción de una disminución significativa de los niveles de los ácidos grasos heneicosanoico (C21:0) y tricosanoico (C23:0) entre los saturados; el erúcico (C22:1n9) entre los AGMI y el dihomo- γ -linolénico (C20:3n6), AA (C20:4n6) y eicosatetraenoico (C20:4n3) entre los AGPI simultáneamente a un aumento del ácido cis-10-pentadecenoico (C15:1n5) entre los lípidos.

Los niveles de proteínas totales, sodio, potasio, fósforo, azufre, ARNs de pequeño tamaño y los microARNs miR-103, miR-27b, y miR-let-7c disminuyeron a lo largo de los tres meses de lactancia; en dicho período se observó un aumento de los niveles de los AaLT, el sumatorio de AaNE, la glutamina y la serina.

Se identificaron también cambios en los niveles de miR-222, miR-200b, miR-17 y miR-146b que mostraron una evolución en forma de V, es decir, una disminución hacia el segundo mes respecto del primero para volver a aumentar hacia el tercer mes de lactancia. Otros autores han detectado también disminuciones progresivas según avanza la lactancia de forma que el factor tiempo es una variable a tener en cuenta cuando se trabaja con microARNs en leche materna.

Se encontraron diferencias en la composición analizada en función del estado de obesidad materna. En concreto, **la leche madura de las mujeres con sobrepeso u obesidad** fue más pobre en AGMI totales y ácido oleico pero más rica en AGCM totales y ácidos cáprico, láurico

y mirístico entre los ácidos grasos en comparación con las mujeres normopeso durante los primeros tres meses de lactancia. El perfil de aminoácidos también difirió según IMC materno con mayores niveles de arginina, tirosina, glicina, fenilalanina y AaR, especialmente de leucina pero inferiores de glutamina y taurina en mujeres con sobrepeso u obesidad.

Además, las concentraciones de leptina, los niveles de sodio y el ratio Na/K, así como las concentraciones de ARNs de pequeño tamaño totales y los microARNs miR-181a, miR-222 y miR-27a presentaron niveles significativamente superiores en mujeres con sobrepeso u obesidad en comparación con las mujeres normopeso durante los primeros tres meses de lactancia.

El hecho de que la leche materna presente una composición distinta asociada al IMC materno implica la necesidad de profundizar sobre sus consecuencias, en particular las asociadas al crecimiento infantil.

Por ejemplo, en este estudio hemos identificado menores concentraciones de **ácido oleico en leche** de mujeres con sobrepeso u obesidad, y paralelamente se ha observado un mayor aporte de este ácido graso con la dieta en este grupo de mujeres lactantes. Si bien en la cohorte estudiada no se obtuvo una asociación significativa para el oleico frente a las variables de crecimiento infantil, ni un efecto de mediación del efecto del IMC materno sobre la predisposición a la obesidad de la descendencia para este ácido graso, cabe plantearse que la ingesta y biodisponibilidad materna de ácido oleico puede tener un rol metabólico durante la lactancia y cuya repercusión sobre el crecimiento del lactante debería ser evaluado en estudios controlados randomizados.

Mientras que el ácido oleico de la leche materna fue el componente asociado al IMC materno más constante en leche madura durante los primeros tres meses de lactancia, el análisis de **correlaciones entre componentes de la leche materna y variables antropométricas de la descendencia** puso en evidencia el papel relevante de las proteínas bioactivas leptina y adiponectina, los aminoácidos ácido glutámico, treonina y metionina y los microARNs individuales, miR-27a y miR-27b.

La **concentración de leptina en leche materna** se correlacionó positivamente con el IMC materno, la velocidad de crecimiento infantil de 0 a 6 meses y el IMC a los dos años de edad de la descendencia. Estas dos últimas correlaciones se mantuvieron en mujeres con sobrepeso u obesidad pero no en mujeres normopeso al analizar los grupos independientes. Es decir, en mujeres con sobrepeso u obesidad se presentó una asociación positiva entre los niveles de leptina en leche y una mayor velocidad en la ganancia de peso corporal de su descendencia durante los primeros seis meses de vida, así como sobre el IMC a los dos años de edad. La asociación entre el IMC materno y los niveles de leptina en leche materna está en la actualidad

bien documentada (116), sin embargo, la asociación de los niveles de esta adipoquina con el crecimiento y la adiposidad infantil es aún controvertida (31, 127, 145, 369).

En nuestro laboratorio se ha propuesto previamente un papel protector de la leptina durante la lactancia al encontrar una asociación inversa significativa entre su concentración al primer mes de lactancia en mujeres normopeso y el IMC a los 18 y 24 meses de edad de la descendencia (131). Esta observación no ha sido confirmada en la cohorte estudiada, con un mayor número de mujeres normopeso (35 vs 28), aunque otros autores también han observado una relación inversa entre los niveles de leptina en leche materna y distintas variables antropométricas infantiles (146, 376). Si bien en ambos estudios la muestra poblacional era pequeña (19 y 15 respectivamente) y las mujeres tenían distintos IMC entre 18.5 y 42kg/m², lo cual distorsiona los resultados ya que se sabe que en mujeres con sobrepeso u obesidad los niveles de leptina en leche materna son más altos y su descendencia tiene mayor adiposidad infantil (116, 442).

Habida cuenta de que se está intentando evaluar si la relación entre el IMC materno y los niveles de leptina en leche materna se traducen en una asociación con variables del crecimiento infantil, hemos planteado un análisis de mediación para esta adipoquina. Este tipo de análisis permite evaluar si los niveles de leptina en leche materna median en una parte o completamente el efecto que el IMC materno tiene sobre la velocidad de crecimiento infantil.

Los resultados obtenidos en la cohorte estudiada para el análisis de mediación no fueron significativos, lo que nos sugiere por un lado que el tamaño muestral puede ser insuficiente o que sería idóneo trabajar dos análisis paralelos diferenciando según el estado de obesidad materno.. Esta última opción no pudimos llevarla a cabo ya que este tipo de modelos no convergen con tamaños muestrales tan pequeños. También cabe la posibilidad de que otros componentes de la leche materna puedan ser relevantes y modulen independientemente o no con la leptina las características del crecimiento infantil. Sería interesante superar las limitaciones indicadas para en futuros estudios conseguir una aproximación más robusta acerca del papel de la leptina durante la lactancia. Se propondría acercarse a las premisas de la biología de sistemas cuyo requisito fundamental es la aplicación de modelos matemáticos complejos como por ejemplo las curvas de crecimiento latentes que se ajusten, reproduzcan y consigan explicar e inferir los entramados de interrelaciones entre la dieta materna, variables antropométricas maternas, componentes de la leche y crecimiento infantil.

En una revisión reciente disponible sobre la asociación de leptina con la adiposidad infantil, se recomienda para el avance en esta área seguir protocolos estandarizados de muestreo y análisis, reportar siempre el IMC materno y varias variables antropométricas infantiles, especificar la etapa de lactancia correspondiente a la determinación y recoger la muestra de leche en ayunas

(31). Todas estas pautas y en la medida de lo posible, han estado presentes en este estudio y se ha seguido la metodología más ampliamente descrita en la bibliografía.

En definitiva, los resultados obtenidos apuntan a que niveles altos de leptina en leche materna podrían mediar un efecto diferencial asociado al IMC materno de forma que en mujeres con sobrepeso u obesidad favorezcan una resistencia a la insulina en la descendencia de forma que la población infantil sea incapaz de regular adecuadamente su metabolismo.

La concentración de adiponectina en leche se correlacionó negativamente con el peso al nacer de la descendencia pero positivamente con la velocidad en la ganancia de peso corporal de 0 a 6 meses en la cohorte estudiada. Aunque la adiponectina es una adipoquina con un cierto papel protector de la obesidad, cuyos niveles plasmáticos están reducidos en personas obesas (443), nuestros resultados apuntan a que dichos efectos podrían ser distintos durante la etapa de lactancia, tal y como se ha sugerido previamente (145). Así, mayores niveles de adiponectina en leche materna parecen promover la ganancia de peso corporal durante la lactancia, asegurando un aumento de peso corporal adecuado, especialmente en aquellos bebés que presentan un peso al nacer más bajo e independientemente del IMC materno, de acuerdo a las observaciones en la cohorte estudiada.

Las concentraciones de **ácido glutámico y treonina** en leche materna presentaron una correlación inversa frente a la velocidad del crecimiento de la descendencia y ambos presentaron una tendencia a concentraciones inferiores en la leche de mujeres con sobrepeso u obesidad. Los niveles de ácido glutámico son superiores en leche materna en comparación con las leches artificiales mientras que los de treonina son inferiores como se ha indicado en el capítulo 4.3.2. En ambos casos estos aminoácidos han sido propuestos como nutrientes clave en la salud gastrointestinal durante la lactancia por sus efectos sobre el desarrollo del sistema inmunológico de la mucosa intestinal (444, 445). Además, el ácido glutámico se ha propuesto como un regulador de la saciedad (387) y la homeostasia energética a nivel del sistema nervioso central (446, 447), que podría determinar las diferencias en las habilidades del control de la ingesta energética entre lactantes de leche materna frente a los alimentados con leches artificiales (139). Así, mayores niveles en leche materna de mujeres normopeso, podrían contribuir a frenar una ganancia rápida de peso corporal durante los primeros seis meses de vida, lo cual constituiría un importante factor nutricional de prevención temprana del desarrollo de obesidad, a diferencia de lo que ocurre en mujeres obesas. Por lo que respecta a la treonina, no conocemos hasta la fecha funciones asociadas que vayan en línea con nuestras observaciones.

Entre los aminoácidos también se identificó una correlación negativa entre las concentraciones de **metionina** y el peso al nacer de la descendencia, encontrando mayores niveles en leche

materna de mujeres que dieron a luz bebés con un peso al nacer más bajo. Aunque es prematuro proponerlo, esta observación podría responder a la implicación directa de este aminoácido en reacciones de transmetilación involucradas en la regulación epigenética de la expresión de genes relacionados con la programación metabólica (69, 72).

Por último y en lo relativo a las asociaciones entre componentes de la leche materna y variables de crecimiento infantil, observamos que prácticamente todos los **microARNs específicos** determinados en este estudio presentaron una correlación directa frente a la velocidad de crecimiento de la descendencia así como con el IMC materno, que fue más relevante para los microARNs **miR-27b** y **miR-27a**. Ello nos llevó a plantear un análisis de mediación del efecto del IMC materno sobre la velocidad en la ganancia de peso corporal de la descendencia para estos dos microARNs, obteniendo resultados significativos de una mediación parcial del efecto. Así, proponemos a estos dos microARNs, **miR-27b** y **miR-27a**, como potenciales **mediadores de la transmisión epigenética de la obesidad materna a su descendencia a través de la leche materna**.

En el transcurso de este estudio tuvimos en cuenta distintas variables clasificadas como confusoras del análisis principal de los factores de interés (IMC materno y sexo del lactante), que para ciertos casos resultaron tener un papel relevante sobre la composición de la leche materna. Concretamente, se observó un perfil de Aa dependiente de **la edad gestacional** con niveles más altos de AaR y glicina en nacimientos a término en comparación con pre-término. Contrariamente los niveles de los minerales sodio, potasio, magnesio y fósforo y el total de ARNs de pequeño tamaño fueron inferiores en **partos a término frente a los pre-término**.

De la misma manera, la **estación en la que tuvo lugar el parto** se identificó como un factor de interés en el estudio de la composición de la leche materna, ya que observamos diferencias asociadas para varios componentes. En concreto, los niveles de proteínas totales, de IgA, ácido heneicosanoico (C21:0) y los microARNs miR-200b y miR-146b presentaron mayores niveles, mientras que el ácido caprílico (C8:0) y el calcio presentaron niveles inferiores cuando el nacimiento tuvo lugar durante los meses de Invierno-Primavera.

La fuerte asociación encontrada entre la estación en la que tuvo lugar el parto y las **concentraciones de calcio en la leche materna**, llamaron especialmente nuestra atención. Específicamente observamos niveles de calcio inferiores en mujeres que parieron durante los meses de Invierno-Primavera frente a las que lo hicieron durante los meses de Verano-Otoño independientemente de las **ingestas maternas de calcio y vitamina D**. Existe bibliografía que respalda esta última observación mediada por un estatus de vitamina D diferente según la exposición solar (84). Además, el estatus de vitamina D se ha relacionado con el desarrollo de obesidad (274), lo cual nos hizo pensar en el calcio como un posible mediador perinatal de la

predisposición a la obesidad de la descendencia que jugaría un papel importante al no estar aún adaptado al estilo de vida cada vez más protegido de la exposición solar que ha ganado terreno en las últimas décadas.

Esta hipótesis no fue confirmada mediante el análisis de mediación del calcio, aunque los resultados sugieren un papel protector frente a la obesidad de la descendencia que van en consonancia con las diferencias observadas en el crecimiento infantil entre sexos según el IMC materno. Es decir, identificamos mayores niveles de calcio y un ratio Ca/P más alto en mujeres con sobrepeso u obesidad frente a las normopeso y que tuvieron una niña, mientras que la tendencia fue en sentido contrario en obesas que tuvieron un niño. Este patrón diferencial se observó también para el IMC de la descendencia a los dos años de edad, por lo que debido al efecto sobre la talla que tiene el estatus osteocálcico y por consecuencia sobre el IMC de la descendencia, ambas observaciones podrían estar relacionadas.

De hecho, el análisis longitudinal ajustado por el IMC materno para las concentraciones de calcio en la leche materna explicó menores IMC en la descendencia durante los primeros dos años de vida. Estos resultados nos llevan a proponer al calcio como un mineral con potenciales funciones protectoras de la predisposición a la obesidad de la descendencia durante la lactancia, modulado por el estatus osteocálcico más que por las ingestas de calcio o vitamina D maternas. De hecho, la **ingesta materna de vitamina D** obtuvo un efecto promotor del IMC en la descendencia y por tanto opuesto al observado para el calcio.

Por último, en este estudio se han trabajado las interrelaciones entre las variables que describieron la ingesta dietética materna frente a los componentes de la leche materna. Aunque en la bibliografía disponemos de algunas revisiones sobre la influencia de la dieta en la composición láctea (57, 59, 80), aquí se ha intentado dar una visión que interrelacione un número elevado de nutrientes de la dieta y bioactivos de la leche materna.

Los resultados mostraron que la **dieta materna tuvo un gran impacto sobre el perfil de ácidos grasos de la leche**. Hasta el momento las ingestas de lípidos y proteínas en la dieta materna y más concretamente el tipo de ácidos grasos son los nutrientes que se han relacionado con cambios sobre el perfil lipídico de la leche (59). Sin embargo, en el presente trabajo hemos observado **asociaciones entre la ingesta de vitaminas, fibra, algunos minerales y también los fitoesteroles con el perfil de ácidos grasos de la leche materna**.

Por ejemplo, el **ratio Na/K de la dieta** se asoció a menores proporciones de AG Omega 3 en la leche, las **ingestas de fibra total y vitaminas C, D y E**, así como los **beta-sitosteroles** y el **magnesio** se relacionaron con un perfil de AG de mayor calidad, rico en Omega 3 en comparación a ingestas más bajas de estos nutrientes y el ratio AA/DHA de la leche se asoció

positivamente con la ingesta de los mismos componentes enumerados además de una lista extendida de micronutrientes. Por su parte, la **ingesta de biotina** presentó una correlación directa intensa para con los niveles de cuatro ácidos grasos de cadena larga: cetoleico, erúcico, DPA y DHA.

También observamos que el **ratio de ingesta de ácidos grasos insaturados frente a la de los saturados** se asociaron con cambios en el perfil de AG y las concentraciones de triglicéridos y proteínas totales de la leche materna. Concretamente, el ratio AGPI+AGMI/AGS de la dieta se asoció con menores niveles de AG saturados y monoinsaturados de cadena media (C14-C18), del ácido linoelaídico, el ácido linolénico conjugado cis-9, cis-11-CLA y los TGs totales mientras que el ratio AGPI/AGS de la dieta se asoció con un perfil rico en AG Omega 3 y proteínas en leche materna madura.

Sin embargo, el **ratio de ingesta de ácidos grasos Omega 6 frente a los Omega 3** no se asoció con ninguno de los componentes de la leche determinados, aunque previamente se ha propuesto como una de las variables más influyentes sobre el perfil de ácidos grasos (80, 448) y el desarrollo de obesidad (79, 267, 449).

Así mismo, las **ingestas de isoleucina, almidón y fitoesteroles mostraron asociaciones con variables descriptoras del crecimiento infantil con un papel promotor de la obesidad para la isoleucina y el almidón y protector para la ingesta de fitoesteroles vegetales que requerirá de mayor atención en futuros estudios.**

Finalmente, el estudio de correlaciones múltiples entre los componentes que resumen la complejidad de variables contemplada en este estudio nos permitió identificar que **un patrón dietético rico en lácteos, frutas y frutos secos con niveles de ingesta mayores de vitamina D y beta-carotenos** se dio con mayor frecuencia en mujeres con un peso corporal adecuado.

Este patrón dietético se asoció a su vez con mayores niveles de AGMI pero menores de AG Omega 6, AGCM, AaE, AaR, arginina, tirosina y leptina en la leche materna. Además, los niveles de los distintos AG enumerados siguieron una relación inversa frente al IMC materno, por lo que sugerimos que el patrón dietético descrito pudiera tener un **papel protector de la predisposición a la obesidad a través de la modulación del perfil lipídico de la leche materna.**

6. Limitaciones del estudio

La principal limitación de este estudio viene determinada por el relativamente pequeño tamaño muestral que determina la potencia estadística de los resultados, si bien dado que se ha planteado como un estudio piloto se puede reconocer que ha permitido abordar la hipótesis de partida y obtener datos relevantes acerca de la influencia de la obesidad materna y el papel de la dieta sobre la programación temprana de la predisposición a la obesidad de la descendencia durante la lactancia materna.

Es decir, el diseño experimental de este estudio piloto ha permitido caracterizar la composición de la leche materna en compuestos de interés seleccionados, valorar el estatus nutricional materno durante la lactancia y proponer factores nutricionales con potencial de participar en la programación temprana de la obesidad durante la etapa de lactancia, cubriendo así la totalidad de los objetivos planteados ante la hipótesis de partida de esta tesis.

Otra potencial limitación se asociaría a su característica de estudio observacional, por lo que un número elevado de variables confusoras (la etnia, la edad materna, el número de partos previos, la estacionalidad del nacimiento, el tipo de parto (natural o por cesárea), la edad gestacional, el tipo de lactancia (exclusiva o mixta), el hábito tabáquico, el estatus socioeconómico y el nivel educativo, la práctica de actividad física, la duración total de la lactancia y la alimentación complementaria) influyen sobre los resultados, particularmente en relación al número de individuos reclutados, lo que ha hecho difícil su interpretación. También asumimos la falta de información paterna, tal como podría ser la presencia de sobrepeso u obesidad, cuyo efecto también podría haber sido contemplado. Si bien, se pretendía caracterizar una cohorte de madres lactantes sin interferir en su dieta y estilo de vida, ni directamente sugiriendo una intervención nutricional concreta, ni indirectamente, como podría ser a través de mensajes subliminales en nuestro contacto con ellas. Así pues, el planteamiento experimental de esta tesis se ha desarrollado en los términos planteados desde su inicio.

En lo relativo a la valoración nutricional de la ingesta alimentaria, entendemos que es una limitación actual y extendida la falta de bases de datos de composición de alimentos estandarizadas, completas y actualizadas. Asimismo, la carencia de valores de ingestas de referencia consensuados para todos los nutrientes a utilizar no facilita la identificación de deficiencias o excesos para algunos de ellos, relevantes en el contexto fisiológico de la lactancia y el crecimiento infantil. Sin embargo, consideramos que el software utilizado, así como la consulta de distintas fuentes bibliográficas para la evaluación de la ingesta, han generado resultados de calidad. Por otra parte, se ha testado la validez y precisión de los datos obtenidos al comparar un cuestionario de frecuencia de consumo y tres recordatorios de 24 horas, como métodos de registro de los datos. Su similitud con la información nutricional reciente que se ha

descrito para la población española general otorga un grado de fiabilidad a los resultados obtenidos en este estudio.

Por otro lado, cabe mencionar el hecho de que algunas determinaciones de la composición de la leche materna no han podido ser realizadas por duplicado o en todos los meses ensayados y que los resultados nulos no se han repetido, por lo que en algunos casos contamos con un cierto número de valores perdidos que afectan la fuerza estadística y, en particular, al análisis de correlaciones.

7. Conclusiones / Conclusions

1. En relación con el estatus nutricional de la cohorte estudiada: La población de mujeres lactantes presentó un estatus nutricional similar e incluso ligeramente de mayor calidad al de la población de mujeres españolas del mismo rango de edad pero igualmente inadecuado. Así, se identificó una ingesta elevada de lípidos, colesterol, sodio y niacina en contraposición a una ingesta insuficiente de carbohidratos y fibra, vitaminas D, E y folatos y los minerales calcio, zinc y yodo. Además, la suplementación con complejos multinutriente no suplió las necesidades detectadas y supuso ingestas inadecuadamente altas para el hierro y la vitamina B12.

Se observaron diferencias en el aporte nutricional asociadas al IMC materno, en concreto, en mujeres con sobrepeso/obesidad se detectó un mayor aporte calórico de AGMI, Omega 6 y Omega 3 pero menor de azúcares totales, glucosa, fructosa y sacarosa y en fitosteroles vegetales en relación a la ingesta observada en mujeres normopeso.

2. La caracterización de la composición de la leche materna mostró su dinamismo a lo largo de los primeros tres meses de lactancia para varios ácidos grasos y aminoácidos individuales, proteínas y aminoácidos libres totales, varios minerales y el total de ARNs de pequeño tamaño purificados. Además en este estudio hemos observado un descenso de los microARNs miR-103, miR-27b, y miR-let-7c a lo largo de los 3 meses estudiados y de miR-222, miR-200b, miR-17 y miR-146b de forma acusada en los dos primeros meses de lactancia.

La leche de las mujeres con sobrepeso u obesidad fue más pobre en AGMI totales y ácido oleico pero más rica en AGCM totales y ácidos cáprico, láurico y mirístico en comparación con las mujeres normopeso durante los tres meses de lactancia. El perfil de aminoácidos también difirió según el grado de obesidad materno, con mayores niveles de arginina, tirosina, glicina, fenilalanina y leucina pero inferiores de glutamina y taurina en sobrepeso/obesidad. Además, las concentraciones de leptina, los niveles de sodio y el ratio Na/K, así como las concentraciones de ARNs de pequeño tamaño totales y los microARNs miR-181a, miR-222 y miR-27a presentaron niveles superiores significativamente en mujeres con sobrepeso u obesidad en comparación con las mujeres normopeso durante los primeros tres meses de lactancia.

3. En relación a los factores presentes en leche que pueden modular el crecimiento infantil se detectaron como de especial relevancia: leptina, adiponectina, los microARNs miR-27a y miR-27b, aminoácidos libres y calcio.

a) Se observó que la concentración de leptina en leche materna se asoció positivamente con el IMC materno y con la ganancia de peso de la descendencia en mujeres con sobrepeso u obesidad, pero no en aquellas con normopeso; lo que indicaría una mayor predisposición a la obesidad en la progenie de madres obesas.

b) Asimismo, se observó una correlación inversa entre los niveles de adiponectina en leche materna y el peso al nacer pero positiva con la ganancia de peso durante los primeros seis meses de vida de la descendencia, lo cual sugiere un papel pro-obesidad de esta proteína durante la etapa perinatal, contrariamente al papel protector otorgado en la edad adulta.

c) Los microARNs miR-27a y miR-27b presentaron una correlación positiva frente a la velocidad de crecimiento de la descendencia así como con el IMC materno, lo cual sugiere un papel mediador del efecto que el IMC materno tiene sobre la evolución del peso corporal de la descendencia.

d) Se identificó un perfil pobre en ácido glutámico, asparragina, serina, glutamina y treonina en leche materna de mujeres con sobrepeso/obesidad. Los niveles individuales de ácido glutámico y treonina presentaron una asociación negativa frente a la velocidad de crecimiento de la descendencia, lo que pone en relieve a estos aminoácidos sobre el resto en la regulación del metabolismo perinatal, concretamente durante la lactancia materna.

e) La concentración de calcio en leche materna fue menor en mujeres que parieron durante los meses de Invierno-Primavera y mostró un efecto diferencial asociado al IMC materno y sexo del lactante de igual manera que lo presentó el IMC a los dos años de la descendencia. Es decir, identificamos mayores niveles de calcio en mujeres con sobrepeso u obesidad frente a las normopeso y que tuvieron una niña, mientras que la tendencia fue en sentido contrario en obesas que tuvieron un niño. Este patrón diferencial se observó también para el IMC de la descendencia a los dos años de edad, por lo que debido al efecto sobre la talla que tiene el estatus osteocálcico y por consecuencia sobre el IMC de la descendencia, ambas observaciones podrían estar relacionadas.

4.- La dieta materna durante la lactancia tuvo un impacto generalizado sobre los componentes analizados en leche, cuyo efecto más intenso fue sobre el perfil de los ácidos grasos.

a) Los niveles de ácidos grasos en leche se asociaron con la ingesta de lípidos (ácido mirístico, AGS, AGMI y AGPI), pero también de proteínas y aminoácidos, azúcares, fibra, vitaminas (especialmente la B8 y la vitamina E) y los beta-sitosteroles. Se detectaron menores concentraciones de Omega 3 y proteínas totales en leche asociadas a la ingesta de sodio.

b) Los niveles de proteínas en leche fueron superiores en relación a una mayor ingesta relativa de AGPI y de fibra y menor de colesterol y de sodio con la dieta.

c) Los niveles del miR-222 en leche se asociaron positivamente con la ingesta de proteínas totales y los del miR-103 se correlacionaron negativamente con la ingesta de sacarosa.

d) Los niveles de minerales en leche materna no se vieron afectados por la ingesta de los mismos a través de la dieta sino que aumentaron en función de la ingesta de grasa y disminuyeron ante la de hidratos de carbono.

5.- En relación a los factores nutricionales identificados por su potencial interés en la programación temprana del desarrollo de obesidad durante la lactancia:

a) Las ingestas de isoleucina, almidón, vitamina D y fitoesteroles son componentes de la dieta materna que han mostrado asociaciones significativas con variables antropométricas de la descendencia y simultáneamente con algunos componentes de la leche materna.

b) Los niveles de sodio, ácido oleico, leptina, ácido glutámico, calcio, miR-27a y miR-27b en leche materna se han identificado como componentes con potencial mediador del efecto de la dieta materna o el IMC materno sobre variables descriptoras del crecimiento infantil.

1. Regarding the nutritional status of the cohort studied: The population of lactating women presented a nutritional status similar and even of slightly higher quality than the population of Spanish women in the same age range, but still inadequate. Thus, a high intake of lipids, cholesterol, sodium, and niacin as opposed to insufficient intake of carbohydrates and fiber, vitamins D, E and folates and minerals calcium, zinc and iodine were identified. In addition, supplementation with multinutrient complexes did not satisfy the nutritional requirements and were inappropriately high for iron and vitamin B12 intakes.

We observed differences in the dietary intake of nutrients associated to maternal BMI. Particularly, women with overweight/obesity showed higher intake of MUFA, Omega 6 and Omega 3 fatty acids whereas intake of total sugars, glucose, fructose, sucrose and plant phytosterols were lower relative to normo-weight women.

2. Human milk characterization showed that the composition of breast milk was dynamic throughout the first three months of lactation for various individual amino acids and fatty acids, proteins and total free amino acids, various minerals and total small RNAs. In this study, we also observed a decrease in miR-103, miR-27b, and miR-let-7c throughout the three months studied and miR-222, miR-200b, miR-17 and miR-146b in the first two months of lactation.

Breast milk of overweight/obese women was poorer in total MUFA and oleic acid but richer in total MCFA and capric, lauric and myristic acids compared with normal weight women during the three months of lactation. The amino acid profile also differed according to the degree of maternal obesity, with higher levels of arginine, tyrosine, glycine, phenylalanine and leucine but lower glutamine and taurine in overweight/obese women. In addition, concentrations of leptin, sodium levels and the ratio Na/K, as well as the concentrations of total small RNAs and the specific miR-181a, miR-222 and miR-27a showed higher levels in overweight/obese women compared with normal weight women during the first three months of lactation.

3. Regarding milk factors that could modulate infant growth, we identified as particularly important: leptin, adiponectin, the microRNAs miR-27a and miR-27b, free amino acids and calcium.

a) Breast milk leptin concentration was positively associated to maternal BMI and infant weight gain in overweight/obese women but not in those with normal weight; which would indicate a greater predisposition to obesity in offspring of obese mothers.

b) Breast milk adiponectin concentration was inversely correlated with infant birth weight but positively with infant weight gain during the first six months of life, suggesting a pro-obesity role for this protein during the perinatal period, in contrast with its protective role attributed in adulthood.

c) MicroRNAs miR-27a and miR-27b showed a positive correlation with infant growth rate during the first six months of lactation as well as with maternal BMI, suggesting a mediating role of the effect that maternal BMI has on the evolution of body weight gain in offspring.

d) Overweight/obese women presented a poor profile in glutamic acid, glutamine, asparagine, serine and threonine in their breast milk. The individual levels of glutamic acid and threonine showed a negative association against infant growth rate, which highlights these amino acids as potential regulators of perinatal metabolism, specifically during breastfeeding.

e) Breast milk calcium concentration was lower in women who gave birth during the months of Winter-Spring and showed a differential effect associated with maternal BMI and both infant gender and infant BMI at two years of age. Higher levels of calcium in milk of overweight/obese women that had a baby girl were observed in comparison with normal weight women, whereas the trend was in the opposite direction when they had a baby boy. This differential pattern was also observed for infant BMI at two years of age. So, these two observations might be related taking into account the role of calcium on bone metabolism and the influence of height on infant BMI.

4. Maternal diet during lactation had a widespread impact on the components analyzed in milk, which was more intense on the fatty acids profile.

a) The fatty acid levels in milk were associated with lipid intake (myristic acid, SFA, MUFA and PUFA), but also with the intake of proteins and amino acids, sugars, fiber, vitamins (especially B8 and vitamin E) and beta-sitosterol. Lower concentrations of Omega 3 fatty acids and total protein content in milk were found associated with higher sodium intakes.

b) Milk protein content was higher in relation to higher PUFA and fiber intakes but lower cholesterol and sodium intakes.

c) MiR-222 levels in milk were positively associated with total protein intake while miR-103 levels were negatively correlated with sucrose intake.

d) Mineral levels in breast milk were not affected by their dietary intake, but were positively associated with fat intake and negatively associated with carbohydrate intake.

5. In relation to the nutritional factors identified for their potential interest in the early programming of obesity development during lactation:

a) Intakes of isoleucine, starch, vitamin D and phytosterols are components of the maternal diet that have shown significant associations with infant anthropometric variables and simultaneously with some components of breast milk.

b) The levels of sodium, oleic acid, leptin, glutamic acid, calcium, miR-27a and miR-27b in breast milk have been identified as components with a potential mediator effect of maternal diet or maternal BMI on descriptive variables of infant growth.

8. Bibliografía

1. Varela Moreiras G, Requejo Marcos AM, Ortega Anta RM, Zamora Navarro S, Salas Salvadó J, Cabrerizo García L, Aranceta Bartrina J, Ávila Torres JM, Murillo Ramos JJ, Belmonte Cortés S, et al. Libro blanco de la nutrición en España. In: (FEN) FEDIN, ed.: Lesinguer, S.L., 2013.
2. (NCD-RisC) NRFC. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *Lancet* 2016;387(10026):1377-96. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30054-X.
3. Collaboration GBM. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet* 2016; 388(10046):776-86. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30175-1.
4. Zomer E, Gurusamy K, Leach R, Trimmer C, Lobstein T, Morris S, James WP, Finer N. Interventions that cause weight loss and the impact on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2016;17(10):1001-11. doi: 10.1111/obr.12433.
5. Wang J, Yang DL, Chen ZZ, Gou BF. Associations of body mass index with cancer incidence among populations, genders, and menopausal status: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol* 2016;42:1-8. doi: 10.1016/j.canep.2016.02.010.
6. Qin B, Yang M, Fu H, Ma N, Wei T, Tang Q, Hu Z, Liang Y, Yang Z, Zhong R. Body mass index and the risk of rheumatoid arthritis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 2015;17:86. doi: 10.1186/s13075-015-0601-x.
7. Palermo A, Tuccinardi D, Defeudis G, Watanabe M, D'Onofrio L, Lauria Pantano A, Napoli N, Pozzilli P, Manfrini S. BMI and BMD: The Potential Interplay between Obesity and Bone Fragility. *Int J Environ Res Public Health* 2016;13(6). doi: 10.3390/ijerph13060544.
8. Wehrmeister FC, Menezes AM, Muniz LC, Martínez-Mesa J, Domingues MR, Horta BL. Waist circumference and pulmonary function: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev* 2012;1:55. doi: 10.1186/2046-4053-1-55.
9. Brands B, Demmelmair H, Koletzko B, Project TE. How growth due to infant nutrition influences obesity and later disease risk. *Acta Paediatr* 2014;103(6):578-85. doi: 10.1111/apa.12593.
10. Serra-Majem L, Aranceta Bartrina J, Pérez-Rodrigo C, Ribas-Barba L, Delgado-Rubio A. Prevalence and determinants of obesity in Spanish children and young people. *Br J Nutr* 2006;96 Suppl 1:S67-72.
11. Temples HS, Willoughby D, Holaday B, Rogers CR, Wueste D, Bridges W, Saffery R, Craig JM. Breastfeeding and Growth of Children in the Peri/postnatal Epigenetic Twins Study (PETS): Theoretical Epigenetic Mechanisms. *J Hum Lact* 2016;32(3):481-8. doi: 10.1177/0890334416637594.
12. American Heart Association. Internet: http://www.heart.org/HEARTORG/HealthyLiving/HealthyKids/ChildhoodObesity/Overweight-in-Children_UCM_304054_Article.jsp - .V45075OLRZI, 2016.
13. Sturm R. The effects of obesity, smoking, and drinking on medical problems and costs. *Health Aff (Millwood)* 2002;21(2):245-53.
14. Withrow D, Alter DA. The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. *Obes Rev* 2011;12(2):131-41. doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00712.x.

15. Benyshek DC. The "early life" origins of obesity-related health disorders: new discoveries regarding the intergenerational transmission of developmentally programmed traits in the global cardiometabolic health crisis. *Am J Phys Anthropol* 2013;152 Suppl 57:79-93. doi: 10.1002/ajpa.22393.
16. Anderson L, Foster S, Flynn R, Fitterman M. Assessing public policies and assets that affect obesity risk while building new public health partnerships, New Hampshire, 2011. *Prev Chronic Dis* 2013;10:E134. doi: 10.5888/pcd10.120349.
17. Borys JM, Le Bodo Y, Jebb SA, Seidell JC, Summerbell C, Richard D, De Henauw S, Moreno LA, Romon M, Visscher TL, et al. EPODE approach for childhood obesity prevention: methods, progress and international development. *Obes Rev* 2012;13(4):299-315. doi: 10.1111/j.1467-789X.2011.00950.x.
18. Saavedra JM, Deming D, Dattilo A, Reidy K. Lessons from the feeding infants and toddlers study in north america: what children eat, and implications for obesity prevention. *Ann Nutr Metab* 2013;62 Suppl 3:27-36. doi: 10.1159/000351538.
19. Picó C, Palou M, Priego T, Sánchez J, Palou A. Metabolic programming of obesity by energy restriction during the perinatal period: different outcomes depending on gender and period, type and severity of restriction. *Front Physiol* 2012;3:436. doi: 10.3389/fphys.2012.00436.
20. Innis SM. Metabolic programming of long-term outcomes due to fatty acid nutrition in early life. *Matern Child Nutr* 2011;7 Suppl 2:112-23. doi: 10.1111/j.1740-8709.2011.00318.x.
21. Ramakrishnan U, Grant F, Goldenberg T, Zongrone A, Martorell R. Effect of women's nutrition before and during early pregnancy on maternal and infant outcomes: a systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2012;26 Suppl 1:285-301. doi: 10.1111/j.1365-3016.2012.01281.x.
22. Organización Mundial de la Salud (OMS). Internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>, 2016.
23. Lopomo A, Burgio E, Migliore L. Epigenetics of Obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2016;140:151-84. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.02.002.
24. Shungin D, Winkler TW, Croteau-Chonka DC, Ferreira T, Locke AE, Mägi R, Strawbridge RJ, Pers TH, Fischer K, Justice AE, et al. New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution. *Nature* 2015;518(7538):187-96. doi: 10.1038/nature14132.
25. Yazdi FT, Clee SM, Meyre D. Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. *PeerJ* 2015;3:e856. doi: 10.7717/peerj.856.
26. Hruby A, Manson JE, Qi L, Malik VS, Rimm EB, Sun Q, Willett WC, Hu FB. Determinants and Consequences of Obesity. *Am J Public Health* 2016;106(9):1656-62. doi: 10.2105/AJPH.2016.303326.
27. Huvenne H, Dubern B, Clément K, Poitou C. Rare Genetic Forms of Obesity: Clinical Approach and Current Treatments in 2016. *Obes Facts* 2016;9(3):158-73. doi: 10.1159/000445061.
28. Singhal A. The role of infant nutrition in the global epidemic of non-communicable disease. *Proc Nutr Soc* 2016;75(2):162-8. doi: 10.1017/S0029665116000057.
29. Yan J, Liu L, Zhu Y, Huang G, Wang PP. The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis. *BMC Public Health* 2014;14:1267. doi: 10.1186/1471-2458-14-1267.
30. Zalewski BM, Patro B, Veldhorst M, Kouwenhoven S, Escobar PC, Lerma JC, Koletzko B, Van Goudoever JB, Szajewska H. Nutrition of Infants and Young Children (1-3 Years) and its Effect on Later Health: A Systematic Review of Current Recommendations (EarlyNutrition Project). *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016;57(3):489-500. doi: 10.1080/10408398.2014.888701.
31. Fields DA, Schneider CR, Pavela G. A narrative review of the associations between six bioactive components in breast milk and infant adiposity. *Obesity (Silver Spring)* 2016;24(6):1213-21. doi: 10.1002/oby.21519.

32. Escribano J, Luque V, Ferre N, Mendez-Riera G, Koletzko B, Grote V, Demmelmair H, Bluck L, Wright A, Closa-Monasterolo R, et al. Effect of protein intake and weight gain velocity on body fat mass at 6 months of age: the EU Childhood Obesity Programme. *Int J Obes (Lond)* 2012;36(4):548-53. doi: 10.1038/ijo.2011.276.
33. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 2013;60(1):49-74. doi: 10.1016/j.pcl.2012.10.002.
34. Lönnerdal B. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *Am J Clin Nutr* 2014;99(3):712S-7S. doi: 10.3945/ajcn.113.071993.
35. Han L, Li M, Yu X, Sun X, Wang D. [Assay of adiponectin, leptin, true insulin and ghrelin levels in preterm human milk, and its relationship with infants growth]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2014;52(7):510-5.
36. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev* 2006;82(8):485-91. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2006.07.001.
37. Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007;261(5):412-7. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x.
38. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35(7):595-601.
39. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860-921. doi: 10.1038/35057062.
40. Fairweather-Tait SJ. Human nutrition and food research: opportunities and challenges in the post-genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358(1438):1709-27. doi: 10.1098/rstb.2003.1377.
41. Koletzko B, Brands B, Poston L, Godfrey K, Demmelmair H, Project EN. Early nutrition programming of long-term health. *Proc Nutr Soc* 2012;71(3):371-8. doi: 10.1017/S0029665112000596.
42. Alsaweed M, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. MicroRNAs in Breastmilk and the Lactating Breast: Potential Immunoprotectors and Developmental Regulators for the Infant and the Mother. *Int J Environ Res Public Health* 2015;12(11):13981-4020. doi: 10.3390/ijerph121113981.
43. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010;56(11):1733-41. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405.
44. Modepalli V, Kumar A, Hinds LA, Sharp JA, Nicholas KR, Lefevre C. Differential temporal expression of milk miRNA during the lactation cycle of the marsupial tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *BMC Genomics* 2014;15:1012. doi: 10.1186/1471-2164-15-1012.
45. Lässer C, Eldh M, Lötval J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp* 2012(59):e3037. doi: 3037 [pii] 10.3791/3037.
46. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filén JJ, Lahesmaa R, Norman M, Neve EP, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* 2007;179(3):1969-78. doi: 179/3/1969 [pii].
47. Gu Y, Li M, Wang T, Liang Y, Zhong Z, Wang X, Zhou Q, Chen L, Lang Q, He Z, et al. Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes. *PLoS One* 2012;7(8):e43691. doi: PONE-D-12-12351 [pii] 10.1371/journal.pone.0043691.
48. Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol* 2010;3(5):478-81. doi: 10.4161/cib.3.5.12693.
49. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010;285(23):17442-52. doi: M110.107821 [pii] 10.1074/jbc.M110.107821.

50. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* 2012;22(3):125-32. doi: 10.1016/j.tcb.2011.12.001.
51. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell* 2012;3(1):28-37. doi: 10.1007/s13238-012-2003-z.
52. Vaag AA, Grunnet LG, Arora GP, Brøns C. The thrifty phenotype hypothesis revisited. *Diabetologia* 2012;55(8):2085-8. doi: 10.1007/s00125-012-2589-y.
53. Sebert S, Sharkey D, Budge H, Symonds ME. The early programming of metabolic health: is epigenetic setting the missing link? *Am J Clin Nutr* 2011;94(6 Suppl):1953S-8S. doi: 10.3945/ajcn.110.001040.
54. Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 3:17-35.
55. Redsell SA, Edmonds B, Swift JA, Siriwardena AN, Weng S, Nathan D, Glazebrook C. Systematic review of randomised controlled trials of interventions that aim to reduce the risk, either directly or indirectly, of overweight and obesity in infancy and early childhood. *Matern Child Nutr* 2016;12(1):24-38. doi: 10.1111/mcn.12184.
56. de Waard M, Brands B, Kouwenhoven SM, Lerma JC, Crespo-Escobar P, Koletzko B, Zalewski BM, van Goudoever JB. Optimal Nutrition In Lactating Women And Its Effect On Later Health Of Offspring: A Systematic Review Of Current Evidence And Recommendations (Early Nutrition Project). *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016;0. doi: 10.1080/10408398.2016.1158149.
57. Valentine CJ, Wagner CL. Nutritional management of the breastfeeding dyad. *Pediatr Clin North Am* 2013;60(1):261-74. doi: 10.1016/j.pcl.2012.10.008.
58. Parlee SD, MacDougald OA. Maternal nutrition and risk of obesity in offspring: the Trojan horse of developmental plasticity. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842(3):495-506. doi: 10.1016/j.bbdis.2013.07.007.
59. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev* 2015;91(11):629-35. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013.
60. Tzanetakou IP, Mikhailidis DP, Perrea DN. Nutrition During Pregnancy and the Effect of Carbohydrates on the Offspring's Metabolic Profile: In Search of the "Perfect Maternal Diet". *Open Cardiovasc Med J* 2011;5:103-9. doi: 10.2174/1874192401105010103.
61. Ortega RM, Rodríguez-Rodríguez E, Aparicio A, Jiménez-Ortega AI, Palmeros C, Perea JM, Navia B, López-Sobaler AM. Young children with excess of weight show an impaired selenium status. *Int J Vitam Nutr Res* 2012;82(2):121-9. doi: 10.1024/0300-9831/a000101.
62. Ortega RM, Rodríguez-Rodríguez E, Aparicio A, Jiménez AI, López-Sobaler AM, González-Rodríguez LG, Andrés P. Poor zinc status is associated with increased risk of insulin resistance in Spanish children. *Br J Nutr* 2012;107(3):398-404. doi: 10.1017/S0007114511003114.
63. Joven J, Micol V, Segura-Carretero A, Alonso-Villaverde C, Menéndez JA, For The Bioactive Food Components Platform. Polyphenols and the modulation of gene expression pathways: can we eat our way out of the danger of chronic disease? *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014;54(8):985-1001. doi: 10.1080/10408398.2011.621772.
64. Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Malavolta M, Basso A, Piacenza F, Ostan R, Cevenini E, Gonos ES, Monti D. Micronutrient-gene interactions related to inflammatory/immune response and antioxidant activity in ageing and inflammation. A systematic review. *Mech Ageing Dev* 2014;136-137:29-49. doi: 10.1016/j.mad.2013.12.007.
65. Muhlhausler BS, Gugusheff JR, Ong ZY, Vithayathil MA. Nutritional approaches to breaking the intergenerational cycle of obesity. *Can J Physiol Pharmacol* 2013;91(6):421-8. doi: 10.1139/cjpp-2012-0353.

66. Gezmish O, Black MJ. Vitamin D deficiency in early life and the potential programming of cardiovascular disease in adulthood. *J Cardiovasc Transl Res* 2013;6(4):588-603. doi: 10.1007/s12265-013-9475-y.
67. Morales E, Rodriguez A, Valvi D, Iñiguez C, Esplugues A, Vioque J, Marina LS, Jiménez A, Espada M, Dehli CR, et al. Deficit of vitamin D in pregnancy and growth and overweight in the offspring. *Int J Obes (Lond)* 2014;39(1):61-8. doi: 10.1038/ijo.2014.165.
68. Ueda H, Nakai T, Konishi T, Tanaka K, Sakazaki F, Min KS. Effects of zinc deficiency and supplementation on leptin and leptin receptor expression in pregnant mice. *Biol Pharm Bull* 2014;37(4):581-7.
69. Wang J, Wu Z, Li D, Li N, Dindot SV, Satterfield MC, Bazer FW, Wu G. Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. *Antioxid Redox Signal* 2012;17(2):282-301. doi: 10.1089/ars.2011.4381.
70. Granados N, Amengual J, Ribot J, Musinovic H, Ceresi E, von Lintig J, Palou A, Bonet ML. Vitamin A supplementation in early life affects later response to an obesogenic diet in rats. *Int J Obes (Lond)* 2013;37(9):1169-76. doi: 10.1038/ijo.2012.190.
71. Perng W, Rozek LS, Mora-Plazas M, Duchin O, Marin C, Forero Y, Baylin A, Villamor E. Micronutrient status and global DNA methylation in school-age children. *Epigenetics* 2012;7(10):1133-41. doi: 10.4161/epi.21915.
72. Shea TB, Rogers E. Lifetime requirement of the methionine cycle for neuronal development and maintenance. *Curr Opin Psychiatry* 2014;27(2):138-42. doi: 10.1097/YCO.0000000000000046.
73. Ortega RM, López-Sobaler AM, Andrés P, Rodríguez-Rodríguez E, Aparicio A, Perea JM. Folate status in young overweight and obese women: changes associated with weight reduction and increased folate intake. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2009;55(2):149-55.
74. Binder AM, Michels KB. The causal effect of red blood cell folate on genome-wide methylation in cord blood: a Mendelian randomization approach. *BMC Bioinformatics* 2013;14:353. doi: 10.1186/1471-2105-14-353.
75. Lee HS, Barraza-Villarreal A, Hernandez-Vargas H, Sly PD, Biessy C, Ramakrishnan U, Romieu I, Herceg Z. Modulation of DNA methylation states and infant immune system by dietary supplementation with ω -3 PUFA during pregnancy in an intervention study. *Am J Clin Nutr* 2013;98(2):480-7. doi: 10.3945/ajcn.112.052241.
76. Rodríguez-Rodríguez E, López-Sobaler AM, Navarro AR, Bermejo LM, Ortega RM, Andrés P. Vitamin B6 status improves in overweight/obese women following a hypocaloric diet rich in breakfast cereals, and may help in maintaining fat-free mass. *Int J Obes (Lond)* 2008;32(10):1552-8. doi: 10.1038/ijo.2008.131.
77. Donahue SM, Rifas-Shiman SL, Gold DR, Jouni ZE, Gillman MW, Oken E. Prenatal fatty acid status and child adiposity at age 3 y: results from a US pregnancy cohort. *Am J Clin Nutr* 2011;93(4):780-8. doi: ajcn.110.005801 [pii] 10.3945/ajcn.110.005801.
78. Gibson RA, Muhlhausler B, Makrides M. Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern Child Nutr* 2011;7 Suppl 2:17-26. doi: 10.1111/j.1740-8709.2011.00299.x.
79. Brei C, Stecher L, Much D, Karla MT, Amann-Gassner U, Shen J, Ganter C, Karampinos DC, Brunner S, Hauner H. Reduction of the n-6:n-3 long-chain PUFA ratio during pregnancy and lactation on offspring body composition: follow-up results from a randomized controlled trial up to 5 y of age. *Am J Clin Nutr* 2016;103(6):1472-81. doi: 10.3945/ajcn.115.128520.
80. Innis SM. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *Am J Clin Nutr* 2014;99(3):734S-41S. doi: 10.3945/ajcn.113.072595.
81. Ares Segura S, Arena Ansótegui J, Díaz-Gómez NM, *Pediatría erdCdLMdlAEd*. [The importance of maternal nutrition during breastfeeding: Do breastfeeding mothers need

- nutritional supplements?]. *An Pediatr (Barc)* 2015;84(6):347.e1-7. doi: 10.1016/j.anpedi.2015.07.024.
82. Donnay S, Arena J, Lucas A, Velasco I, Ares S, Nutrition WGoDRtIDaTDotSSoEa. Iodine supplementation during pregnancy and lactation. Position statement of the working group on disorders related to iodine deficiency and thyroid dysfunction of the Spanish Society of Endocrinology and Nutrition. *Endocrinol Nutr* 2014;61(1):27-34. doi: 10.1016/j.endonu.2013.05.004.
 83. López Rodríguez M, Sánchez Méndez J, Sánchez Martínez M, Calderay Domínguez M. Suplementos en embarazadas: controversias, evidencias y recomendaciones. *Inf Ter Sist Nac Salud* 2010;34:117-28.
 84. Dawodu A, Davidson B, Woo JG, Peng YM, Ruiz-Palacios GM, Guerrero MeL, Morrow AL. Sun exposure and vitamin d supplementation in relation to vitamin d status of breastfeeding mothers and infants in the global exploration of human milk study. *Nutrients* 2015;7(2):1081-93. doi: 10.3390/nu7021081.
 85. Cao C, O'Brien KO. Pregnancy and iron homeostasis: an update. *Nutr Rev* 2013;71(1):35-51. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00550.x.
 86. López Rodríguez M, Sánchez Méndez J, Sánchez Martínez M, Calderay Domínguez M. Suplementos en embarazadas: controversias, evidencias y recomendaciones. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 2010;34:117-28.
 87. Ghirri P, Lunardi S, Boldrini A. Iodine supplementation in the newborn. *Nutrients* 2014;6(1):382-90. doi: 10.3390/nu6010382.
 88. Kawai K, Spiegelman D, Shankar AH, Fawzi WW. Maternal multiple micronutrient supplementation and pregnancy outcomes in developing countries: meta-analysis and meta-regression. *Bull World Health Organ* 2011;89(6):402-11B. doi: 10.2471/BLT.10.083758.
 89. Ramakrishnan U, Grant FK, Goldenberg T, Bui V, Imdad A, Bhutta ZA. Effect of multiple micronutrient supplementation on pregnancy and infant outcomes: a systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2012;26 Suppl 1:153-67. doi: 10.1111/j.1365-3016.2012.01276.x.
 90. Various authors. *Lactation: Natural Processes, Physiological Responses and Role in Maternity*. NOVA Publisher, 2012.
 91. Gomez-Gallego C, Garcia-Mantrana I, Salminen S, Collado MC. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Semin Fetal Neonatal Med* 2016;21(6):400-405. doi: 10.1016/j.siny.2016.05.003.
 92. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr Rev* 2015;73(7):426-37. doi: 10.1093/nutrit/nuu016.
 93. Pacheco AR, Barile D, Underwood MA, Mills DA. The impact of the milk glycobiome on the neonate gut microbiota. *Annu Rev Anim Biosci* 2015;3:419-45. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-111112.
 94. Lawrence RA, Lawrence RM. *Breastfeeding: a guide for the Medical Professional*. 7th ed. Maryland Heights, Missouri: W.B. Saunders, 2011.
 95. Chen X. Human Milk Oligosaccharides (HMOS): Structure, Function, and Enzyme-Catalyzed Synthesis. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 2015;72:113-90. doi: 10.1016/bs.accb.2015.08.002.
 96. He Y, Lawlor NT, Newburg DS. Human Milk Components Modulate Toll-Like Receptor-Mediated Inflammation. *Adv Nutr* 2016;7(1):102-11. doi: 10.3945/an.115.010090.
 97. Bode L. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum Dev* 2015;91(11):619-22. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001.
 98. Prentice P, Ong KK, Schoemaker MH, van Tol EA, Vervoort J, Hughes IA, Acerini CL, Dunger DB. Breast milk nutrient content and infancy growth. *Acta Paediatr* 2016;105(6):641-7. doi: 10.1111/apa.13362.

99. Delplanque B, Gibson R, Koletzko B, Lapillonne A, Strandvik B. Lipid Quality in Infant Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;61(1):8-17. doi: 10.1097/MPG.0000000000000818.
100. Lopez C, Ménard O. Human milk fat globules: polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;83(1):29-41. doi: S0927-7765(10)00604-1 [pii] 10.1016/j.colsurfb.2010.10.039.
101. Kelishadi R, Hadi B, Iranpour R, Khosravi-Darani K, Mirmoghtadaee P, Farajian S, Poursafa P. A study on lipid content and fatty acid of breast milk and its association with mother's diet composition. *J Res Med Sci* 2012;17(9):824-7.
102. Granot E, Ishay-Gigi K, Malaach L, Flidel-Rimon O. Is there a difference in breast milk fatty acid composition of mothers of preterm and term infants? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015:1-18. doi: 10.3109/14767058.2015.1020785.
103. Lapillonne A, Groh-Wargo S, Gonzalez CH, Uauy R. Lipid needs of preterm infants: updated recommendations. *J Pediatr* 2013;162(3 Suppl):S37-47. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.11.052.
104. Bachour P, Yafawi R, Jaber F, Choueiri E, Abdel-Razzak Z. Effects of Smoking, Mother's Age, Body Mass Index, and Parity Number on Lipid, Protein, and Secretory Immunoglobulin A Concentrations of Human Milk. *Breastfeed Med* 2012;7:179-88. doi: 10.1089/bfm.2011.0038.
105. Carlson SE. Docosahexaenoic acid supplementation in pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr* 2009;89(2):678S-84S. doi: ajcn.2008.26811E [pii] 10.3945/ajcn.2008.26811E.
106. Innis SM. Human milk: maternal dietary lipids and infant development. *Proc Nutr Soc* 2007;66(3):397-404. doi: 10.1017/s0029665107005666.
107. Innis SM. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* 2007;137(4):855-9. doi: 137/4/855 [pii].
108. Innis SM. Omega-3 Fatty acids and neural development to 2 years of age: do we know enough for dietary recommendations? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;48 Suppl 1:S16-24. doi: 00005176-200903001-00004 [pii] 10.1097/MPG.0b013e31819773cf.
109. Lönnerdal B. Human Milk: Bioactive Proteins/Peptides and Functional Properties. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 2016;86:97-107. doi: 10.1159/000442729.
110. Breakey AA, Hinde K, Valeggia CR, Sinofsky A, Ellison PT. Illness in breastfeeding infants relates to concentration of lactoferrin and secretory Immunoglobulin A in mother's milk. *Evol Med Public Health* 2015;2015(1):21-31. doi: 10.1093/emph/eov002.
111. Trend S, Strunk T, Lloyd ML, Kok CH, Metcalfe J, Geddes DT, Lai CT, Richmond P, Doherty DA, Simmer K, et al. Levels of innate immune factors in preterm and term mothers' breast milk during the 1st month postpartum. *Br J Nutr* 2016:1-16. doi: 10.1017/S0007114516000234.
112. Le Huërou-Luron I, Blat S, Boudry G. Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr Res Rev* 2010;23(1):23-36. doi: 10.1017/S0954422410000065.
113. Hettinga K, van Valenberg H, de Vries S, Boeren S, van Hooijdonk T, van Arendonk J, Vervoort J. The host defense proteome of human and bovine milk. *PLoS One* 2011;6(4):e19433. doi: 10.1371/journal.pone.0019433.
114. Minami J, Odamaki T, Hashikura N, Abe F, Xiao JZ. Lysozyme in breast milk is a selection factor for bifidobacterial colonisation in the infant intestine. *Benef Microbes* 2015:1-8. doi: 10.3920/BM2015.0041.
115. Çatlı G, Olgaç Dünder N, Dünder BN. Adipokines in breast milk: an update. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2014;6(4):192-201. doi: 10.4274/Jcrpe.1531.
116. Andreas NJ, Hyde MJ, Gale C, Parkinson JR, Jeffries S, Holmes E, Modi N. Effect of maternal body mass index on hormones in breast milk: a systematic review. *PLoS One* 2014;9(12):e115043. doi: 10.1371/journal.pone.0115043.

117. Kon IY, Shilina NM, Gmoshinskaya MV, Ivanushkina TA. The study of breast milk IGF-1, leptin, ghrelin and adiponectin levels as possible reasons of high weight gain in breast-fed infants. *Ann Nutr Metab* 2014;65(4):317-23. doi: 10.1159/000367998.
118. Sánchez J, Oliver P, Miralles O, Ceresi E, Picó C, Palou A. Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology* 2005;146(6):2575-82. doi: 10.1210/en.2005-0112.
119. Pico C, Jilkova ZM, Kus V, Palou A, Kopecky J. Perinatal programming of body weight control by leptin: putative roles of AMP kinase and muscle thermogenesis. *Am J Clin Nutr* 2011;94(6 Suppl):1830S-7S. doi: 10.3945/ajcn.110.000752.
120. Konieczna J, Sánchez J, Palou M, Picó C, Palou A. Blood cell transcriptomic-based early biomarkers of adverse programming effects of gestational calorie restriction and their reversibility by leptin supplementation. *Sci Rep* 2015;5:9088. doi: 10.1038/srep09088.
121. Palou M, Picó C, McKay JA, Sánchez J, Priego T, Mathers JC, Palou A. Protective effects of leptin during the suckling period against later obesity may be associated with changes in promoter methylation of the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene. *Br J Nutr* 2011;106(5):769-78. doi: 10.1017/S0007114511000973.
122. Konieczna J, García AP, Sánchez J, Palou M, Palou A, Picó C. Oral leptin treatment in suckling rats ameliorates detrimental effects in hypothalamic structure and function caused by maternal caloric restriction during gestation. *PLoS One* 2013;8(11):e81906. doi: 10.1371/journal.pone.0081906.
123. Sánchez J, Priego T, Palou M, Tobaruela A, Palou A, Picó C. Oral supplementation with physiological doses of leptin during lactation in rats improves insulin sensitivity and affects food preferences later in life. *Endocrinology* 2008;149(2):733-40. doi: 10.1210/en.2007-0630.
124. Palou A, Picó C. Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life. *Appetite* 2009;52(1):249-52. doi: 10.1016/j.appet.2008.09.013.
125. Picó C, Oliver P, Sánchez J, Miralles O, Caimari A, Priego T, Palou A. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int J Obes (Lond)* 2007;31(8):1199-209. doi: 10.1038/sj.ijo.0803585.
126. Palou A, Sánchez J, Picó C. Nutrient-gene interactions in early life programming: leptin in breast milk prevents obesity later on in life. *Adv Exp Med Biol* 2009;646:95-104. doi: 10.1007/978-1-4020-9173-5_10.
127. Savino F, Liguori SA, Fissore MF, Oggero R. Breast milk hormones and their protective effect on obesity. *Int J Pediatr Endocrinol* 2009;2009:327505. doi: 10.1155/2009/327505.
128. Khodabakhshi A, Ghayour-Mobarhan M, Rooki H, Vakili R, Hashemy SI, Mirhafez SR, Shakeri MT, Kashanifar R, Pourbafarani R, Mirzaei H, 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):614-8. doi: 10.1038/ejcn.2014.205.
129. Palou A, Picó C. Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life. *Appetite* 2009;52(1):249-52. doi: S0195-6663(08)00567-9 [pii] 10.1016/j.appet.2008.09.013.
130. Picó C, Sánchez J, Oliver P, Palou A. Leptin production by the stomach is up-regulated in obese (fa/fa) Zucker rats. *Obes Res* 2002;10(9):932-8.
131. Miralles O, Sánchez J, Palou A, Picó C. A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14(8):1371-7. doi: 14/8/1371 [pii] 10.1038/oby.2006.155.
132. Oliver P, Pico C, De Matteis R, Cinti S, Palou A. Perinatal expression of leptin in rat stomach. *Dev Dyn* 2002;223(1):148-54.
133. Pico C, Oliver P, Sanchez J, Palou A. Gastric leptin: a putative role in the short-term regulation of food intake. *Br J Nutr* 2003;90(4):735-41.

134. Larnkjær A, Bruun S, Pedersen D, Zachariassen G, Barkholt V, Agostoni C, Mølgaard C, Husby S, Michaelsen KF. Free Amino Acids in Human Milk and Associations with Maternal Anthropometry and Infant Growth. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016. doi: 10.1097/MPG.0000000000001195.
135. Chuang CK, Lin SP, Lee HC, Wang TJ, Shih YS, Huang FY, Yeung CY. Free amino acids in full-term and pre-term human milk and infant formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40(4):496-500.
136. Agostoni C, Carratù B, Boniglia C, Riva E, Sanzini E. Free amino acid content in standard infant formulas: comparison with human milk. *J Am Coll Nutr* 2000;19(4):434-8.
137. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 2009;37(1):1-17. doi: 10.1007/s00726-009-0269-0.
138. Roucher VF, Desnots E, Naël C, Agnoux AM, Alexandre-Gouabau MC, Darmaun D, Boquien CY. Use of UPLC-ESI-MS/MS to quantitate free amino acid concentrations in micro-samples of mammalian milk. *Springerplus* 2013;2:622. doi: 10.1186/2193-1801-2-622.
139. Ventura AK, Beauchamp GK, Mennella JA. Infant regulation of intake: the effect of free glutamate content in infant formulas. *Am J Clin Nutr* 2012;95(4):875-81. doi: 10.3945/ajcn.111.024919.
140. Kim SY, Park JH, Kim EA, Lee-Kim YC. Longitudinal study on trace mineral compositions (selenium, zinc, copper, manganese) in Korean human preterm milk. *J Korean Med Sci* 2012;27(5):532-6. doi: 10.3346/jkms.2012.27.5.532.
141. Sun Z, Yue B, Yang Z, Li X, Wu Y, Yin S. [Determination of 24 minerals in human milk by inductively coupled plasma mass spectrometry with microwave digestion]. *Wei Sheng Yan Jiu* 2013;42(3):504-9.
142. Mathias PC, Elmhiri G, de Oliveira JC, Delayre-Orthez C, Barella LF, Tófolo LP, Fabricio GS, Chango A, Abdennebi-Najar L. Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. *Eur J Nutr* 2014;53(3):711-22. doi: 10.1007/s00394-014-0654-7.
143. Melnik BC, John SM, Schmitz G. Milk is not just food but most likely a genetic transfection system activating mTORC1 signaling for postnatal growth. *Nutr J* 2013;12:103. doi: 10.1186/1475-2891-12-103.
144. Luque V, Closa-Monasterolo R, Escribano J, Ferré N. Early Programming by Protein Intake: The Effect of Protein on Adiposity Development and the Growth and Functionality of Vital Organs. *Nutr Metab Insights* 2015;8(Suppl 1):49-56. doi: 10.4137/NMI.S29525.
145. Brunner S, Schmid D, Zang K, Much D, Knoeferl B, Kratzsch J, Amann-Gassner U, Bader BL, Hauner H. Breast milk leptin and adiponectin in relation to infant body composition up to 2 years. *Pediatr Obes* 2015;10(1):67-73. doi: 10.1111/j.2047-6310.2014.222.x.
146. Doneray H, Orbak Z, Yildiz L. The relationship between breast milk leptin and neonatal weight gain. *Acta Paediatr* 2009;98(4):643-7. doi: 10.1111/j.1651-2227.2008.01192.x.
147. Schuster S, Hechler C, Gebauer C, Kiess W, Kratzsch J. Leptin in maternal serum and breast milk: association with infants' body weight gain in a longitudinal study over six months of lactation. *Pediatr Res* 2011;70(6):633-7. doi: 10.1203/PDR.0b013e31823214ea.
148. Melnik BC. Milk--A Nutrient System of Mammalian Evolution Promoting mTORC1-Dependent Translation. *Int J Mol Sci* 2015;16(8):17048-87. doi: 10.3390/ijms160817048.
149. Trinidad I, Fernández-Ballart J, Cucó G, Biarnés E, Arija V. Validación de un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario corto: reproducibilidad y validez. Spain, 2008.
150. World Health Organization. WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age:

- Methods and development. 2006;312. Internet: <http://www.who.int/childgrowth/publications/en/>.
151. World Health Organization. WHO Child Growth Standards: Head circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age. 2007;217. Internet: <http://www.who.int/childgrowth/publications/en/>.
 152. World Health Organization. WHO Child Growth Standards: Growth velocity based on weight, length and head circumference. *Methods and development*. Geneva, 2009;242.
 153. de Onis M, Onyango A, Borghi E, Siyam A, Blössner M, Lutter C. Worldwide implementation of the WHO Child Growth Standards. *Public Health Nutr* 2012;15(9):1603-10. doi: 10.1017/S136898001200105X.
 154. de Onis M. Update on the implementation of the WHO child growth standards. *World Rev Nutr Diet* 2013;106:75-82. doi: 10.1159/000342550.
 155. World Health Organization. Training Course on Child Growth Assessment. Geneva, 2008.
 156. Maiti S, Ali KM, Ghosh D, Paul S. Assessment of Head Circumference among Pre-school Children of Midnapore Town, West Bengal using WHO (2007) Recommended Cut-off Points. *Int J Prev Med* 2012;3(10):742-4.
 157. World Health Organization and UNICEF. Low birthweight: country, regional and global estimates. 2004.
 158. Organización Mundial de la Salud. La alimentación del lactante y del niño pequeño: capítulo modelo para libros de texto dirigidos a estudiantes de medicina y otras ciencias de la salud. Washington, D.C., 2010.
 159. Clausson B, Gardosi J, Francis A, Cnattingius S. Perinatal outcome in SGA births defined by customised versus population-based birthweight standards. *BJOG* 2001;108(8):830-4.
 160. Ota E, Haruna M, Suzuki M, Anh DD, Tho IH, Tam NT, Thiem VD, Anh NT, Isozaki M, Shibuya K, et al. Maternal body mass index and gestational weight gain and their association with perinatal outcomes in Vietnam. *Bull World Health Organ* 2011;89(2):127-36. doi: 10.2471/BLT.10.077982.
 161. Alonso V, Luna F. Curvas de crecimiento intrauterino de recién nacidos madrileños: peso, talla y perímetro cefálico. 2011;24:7. Internet: <http://www.didac.ehu.es/antropo/24/24-1/Alonso.htm>.
 162. Olsen IE, Groveman SA, Lawson ML, Clark RH, Zemel BS. New intrauterine growth curves based on United States data. *Pediatrics* 2010;125(2):e214-24. doi: 10.1542/peds.2009-0913.
 163. World Health Organization. Born too soon: the global action report on preterm birth, 2012.
 164. Lindgren R, Selbing A, Leander E. Which fetal growth charts should be used? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1988;67(8):683-7.
 165. Kramer MS, Platt RW, Wen SW, Joseph KS, Allen A, Abrahamowicz M, Blondel B, Bréart G, System FIHSGotCPS. A new and improved population-based Canadian reference for birth weight for gestational age. *Pediatrics* 2001;108(2):E35.
 166. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000;320(7244):1240-3.
 167. Lykke JA, Paidas MJ, Triche EW, Langhoff-Roos J. Fetal growth and later maternal death, cardiovascular disease and diabetes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2012;91(4):503-10. doi: 10.1111/j.1600-0412.2011.01355.x.
 168. Cooley SM, Donnelly JC, Walsh T, Kirkham C, Gillan J, Geary MP. Ponderal index (PI) vs birth weight centiles in the low-risk primigravid population: which is the better predictor of fetal wellbeing? *J Obstet Gynaecol* 2012;32(5):439-43. doi: 10.3109/01443615.2012.667172.
 169. van Dijk CE, Innis SM. Growth-curve standards and the assessment of early excess weight gain in infancy. *Pediatrics* 2009;123(1):102-8. doi: 10.1542/peds.2007-3382.

170. Wen X, Kleinman K, Gillman MW, Rifas-Shiman SL, Taveras EM. Childhood body mass index trajectories: modeling, characterizing, pairwise correlations and socio-demographic predictors of trajectory characteristics. *BMC Med Res Methodol* 2012;12:38. doi: 10.1186/1471-2288-12-38.
171. Monteiro PO, Victora CG. Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life--a systematic review. *Obes Rev* 2005;6(2):143-54. doi: 10.1111/j.1467-789X.2005.00183.x.
172. Anta RMO, Sobaler AML, Carvajales PA, Marcos AMR, Vizquete AA, Casares LMM. DIAL 1.0 Programa para evaluación de dietas y gestión de datos de alimentación. Ed. Alce Ingeniería. Las Rozas - Madrid (España), 2008.
173. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1(8476):307-10.
174. Mouratidou T, Ford F, Fraser RB. Validation of a food-frequency questionnaire for use in pregnancy. *Public Health Nutr* 2006;9(4):515-22.
175. Mouratidou T, Ford FA, Fraser RB. Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire in assessing dietary intakes of low-income Caucasian postpartum women living in Sheffield, United Kingdom. *Matern Child Nutr* 2011;7(2):128-39. doi: 10.1111/j.1740-8709.2009.00221.x.
176. Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 1997;65(4 Suppl):1220S-8S; discussion 9S-31S.
177. Hebden L, Kostan E, O'Leary F, Hodge A, Allman-Farinelli M. Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire as a measure of recent dietary intake in young adults. *PLoS One* 2013;8(9):e75156. doi: 10.1371/journal.pone.0075156.
178. Vioque J, Navarrete-Muñoz EM, Gimenez-Monzó D, García-de-la-Hera M, Granado F, Young IS, Ramón R, Ballester F, Murcia M, Rebagliato M, et al. Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire among pregnant women in a Mediterranean area. *Nutr J* 2013;12:26. doi: 10.1186/1475-2891-12-26.
179. Brantsaeter AL, Haugen M, Alexander J, Meltzer HM. Validity of a new food frequency questionnaire for pregnant women in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Matern Child Nutr* 2008;4(1):28-43. doi: 10.1111/j.1740-8709.2007.00103.x.
180. Hoffmann K, Boeing H, Dufour A, Volatier JL, Telman J, Virtanen M, Becker W, De Henauw S, Group E. Estimating the distribution of usual dietary intake by short-term measurements. *Eur J Clin Nutr* 2002;56 Suppl 2:S53-62. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601429.
181. Thompson F, Subar A. *Dietary Assessment Methodology. Nutrition in the prevention and treatment of disease. Third edition.* United States of America: Academic Press by Elsevier, 2008.
182. Moreiras O, Carbajal Á, Cabrera L, Cuadrado C. *Tablas de composición de alimentos. 16ª ed.* Madrid: Grupo Anaya, SA, 2013.
183. Hall Moran V, Lowe N, Crossland N, Berti C, Cetin I, Hermoso M, Koletzko B, Dykes F. Nutritional requirements during lactation. Towards European alignment of reference values: the EURRECA network. *Matern Child Nutr* 2010;6 Suppl 2:39-54. doi: 10.1111/j.1740-8709.2010.00276.x.
184. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). *EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE LA DIETA ESPAÑOLA. I ENERGÍA Y MACRONUTRIENTES Sobre datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE) 2011.*
185. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). *EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE LA DIETA ESPAÑOLA. II MICRONUTRIENTES Sobre datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE). 2011.*
186. Varela-Moreiras G, Ruiz E, Valero T, Avila JM, del Pozo S. The Spanish diet: an update. *Nutr Hosp* 2013;28 Suppl 5:13-20. doi: 10.3305/nh.2013.28.sup5.6914.
187. Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, Vassilakou T, Lipworth L, Trichopoulos D. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ* 1995;311(7018):1457-60.

188. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003;348(26):2599-608. doi: 10.1056/NEJMoa025039.
189. Mennella J. Alcohol's effect on lactation. *Alcohol Res Health* 2001;25(3):230-4.
190. Bondia-Pons I, Moltó-Puigmartí C, Castellote AI, López-Sabater MC. Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by fast gas chromatography. *J Chromatogr A* 2007;1157(1-2):422-9. doi: S0021-9673(07)00871-0 [pii] 10.1016/j.chroma.2007.05.020.
191. Moltó-Puigmartí C, Castellote AI, López-Sabater MC. Conjugated linoleic acid determination in human milk by fast-gas chromatography. *Anal Chim Acta* 2007;602(1):122-30. doi: S0003-2670(07)01518-8 [pii] 10.1016/j.aca.2007.09.011.
192. Marangoni F, Colombo C, Galli C. A method for the direct evaluation of the fatty acid status in a drop of blood from a fingertip in humans: applicability to nutritional and epidemiological studies. *Anal Biochem* 2004;326(2):267-72. doi: S0003269704000399 [pii] 10.1016/j.ab.2003.12.016.
193. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54. doi: S0003269776699996 [pii].
194. Ley SH, Hanley AJ, Stone D, O'Connor DL. Effects of pasteurization on adiponectin and insulin concentrations in donor human milk. *Pediatr Res* 2011;70(3):278-81. doi: 10.1203/PDR.0b013e318224287a.
195. Barbato C, Arisi I, Frizzo ME, Brandi R, Da Sacco L, Masotti A. Computational challenges in miRNA target predictions: to be or not to be a true target? *J Biomed Biotechnol* 2009;2009:803069. doi: 10.1155/2009/803069.
196. Morton N, Emilsson V, Liu Y, Cawthorne M. Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem* 1998;273(40):26194-201.
197. Yuan C, Attele A, Wu J, Zhang L, Shi Z. Peripheral gastric leptin modulates brain stem neuronal activity in neonates. *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 1):G626-30.
198. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau J, Bortoluzzi M, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, et al. The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998;394(6695):790-3.
199. Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laigneau J, Attoub S, Lehy T, Henin D, Mignon M, et al. Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* 2000;47(2):178-83.
200. Breidert M, Miehke S, Glasow A, Orban Z, Stolte M, Ehninger G, Bayerdörffer E, Nettesheim O, Halm U, Haidan A, et al. Leptin and its receptor in normal human gastric mucosa and in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1999;34(10):954-61.
201. Mix H, Widjaja A, Jandl O, Cornberg M, Kaul A, Göke M, Beil W, Kuske M, Brabant G, Manns MP, et al. Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. *Gut* 2000;47(4):481-6.
202. Cinti S, de Matteis R, Ceresi E, Picó C, Oliver J, Oliver P, Palou A, Obrador A, Maffei C. Leptin in the human stomach. *Gut* 2001;49(1):155.
203. Aparicio T, Kermorgant S, Darmoul D, Guilmeau S, Hormi K, Mahieu-Caputo D, Lehy T. Leptin and Ob-Rb receptor isoform in the human digestive tract during fetal development. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(11):6177-84. doi: 10.1210/jc.2005-1498.
204. Hulsmans M, Van Dooren E, Mathieu C, Holvoet P. Decrease of miR-146b-5p in monocytes during obesity is associated with loss of the anti-inflammatory but not insulin signaling action of adiponectin. *PLoS One* 2012;7(2):e32794. doi: 10.1371/journal.pone.0032794.
205. Hilton C, Neville MJ, Karpe F. MicroRNAs in adipose tissue: their role in adipogenesis and obesity. *Int J Obes (Lond)* 2013;37(3):325-32. doi: 10.1038/ijo.2012.59.

206. Xu G, Ji C, Shi C, Fu H, Zhu L, Xu L, Chen L, Feng Y, Zhao Y, Guo X. Modulation of hsa-miR-26b levels following adipokine stimulation. *Mol Biol Rep* 2012;40(5):3577-82. doi: 10.1007/s11033-012-2431-0.
207. Hulsmans M, De Keyzer D, Holvoet P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *FASEB J* 2011;25(8):2515-27. doi: 10.1096/fj.11-181149.
208. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, Sabater M, Hummel M, Ferrer A, Rodriguez-Hermosa JI, Ruiz B, Ricart W, Peral B, et al. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS One* 2010;5(2):e9022. doi: 10.1371/journal.pone.0009022.
209. Liang J, Liu C, Qiao A, Cui Y, Zhang H, Cui A, Zhang S, Yang Y, Xiao X, Chen Y, et al. MicroRNA-29a-c decrease fasting blood glucose levels by negatively regulating hepatic gluconeogenesis. *J Hepatol* 2012;58(3):535-42. doi: S0168-8278(12)00823-9 [pii] 10.1016/j.jhep.2012.10.024.
210. Klötting N, Berthold S, Kovacs P, Schön MR, Fasshauer M, Ruschke K, Stumvoll M, Blüher M. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One* 2009;4(3):e4699. doi: 10.1371/journal.pone.0004699.
211. García-Segura L, Pérez-Andrade M, Miranda-Ríos J. The Emerging Role of MicroRNAs in the Regulation of Gene Expression by Nutrients. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2013;6(1):16-31. doi: 10.1159/000345826.
212. Jordan SD, Krüger M, Willmes DM, Redemann N, Wunderlich FT, Brönneke HS, Merkwirth C, Kashkar H, Olkkonen VM, Böttger T, et al. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nat Cell Biol* 2011;13(4):434-46. doi: 10.1038/ncb2211.
213. Park JH, Ahn J, Kim S, Kwon DY, Ha TY. Murine hepatic miRNAs expression and regulation of gene expression in diet-induced obese mice. *Mol Cells* 2011;31(1):33-8. doi: 10.1007/s10059-011-0009-7.
214. Zhang J, Zhang F, Didelot X, Bruce KD, Cagampang FR, Vatish M, Hanson M, Lehnert H, Ceriello A, Byrne CD. Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. *BMC Genomics* 2009;10:478. doi: 10.1186/1471-2164-10-478.
215. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, Heim MH, Stoffel M. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 2011;474(7353):649-53. doi: 10.1038/nature10112.
216. Zhou Q, Li M, Wang X, Li Q, Wang T, Zhu Q, Zhou X, Gao X, Li X. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *Int J Biol Sci* 2012;8(1):118-23.
217. Chen X, Gao C, Li H, Huang L, Sun Q, Dong Y, Tian C, Gao S, Dong H, Guan D, et al. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res* 2010;20(10):1128-37. doi: 10.1038/cr.2010.80.
218. Sun Q, Chen X, Yu J, Zen K, Zhang CY, Li L. Immune modulatory function of abundant immune-related microRNAs in microvesicles from bovine colostrum. *Protein Cell* 2013;4(3):197-210. doi: 10.1007/s13238-013-2119-9.
219. Munch EM, Harris RA, Mohammad M, Benham AL, Pejerrey SM, Showalter L, Hu M, Shope CD, Maningat PD, Gunaratne PH, et al. Transcriptome Profiling of microRNA by Next-Gen Deep Sequencing Reveals Known and Novel miRNA Species in the Lipid Fraction of Human Breast Milk. *PLoS One* 2013;8(2):e50564. doi: 10.1371/journal.pone.0050564.
220. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010;50(4):298-301. doi: S1046-2023(10)00047-2 [pii] 10.1016/j.ymeth.2010.01.032.
221. Parra P, Serra F, Palou A. Expression of adipose microRNAs is sensitive to dietary conjugated linoleic acid treatment in mice. *PLoS One* 2010;5(9):e13005. doi: 10.1371/journal.pone.0013005.

222. Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem* 2002;303(1):95-8. doi: S0003269701955642 [pii] 10.1006/abio.2001.5564.
223. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3(7):RESEARCH0034.
224. Ruijter JM, Pfaffl MW, Zhao S, Spiess AN, Boggy G, Blom J, Rutledge RG, Sisti D, Lievens A, De Preter K, et al. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods* 2013;59(1):32-46. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.08.011.
225. Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I. NAViGaTing the micronome--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. *PLoS One* 2011;6(2):e17429. doi: 10.1371/journal.pone.0017429.
226. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 2015;4. doi: 10.7554/eLife.05005.
227. Heneghan HM, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(5):E846-50. doi: 10.1210/jc.2010-2701.
228. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;39(Database issue):D152-7. doi: 10.1093/nar/gkq1027.
229. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 2009;37(6):e45. doi: 10.1093/nar/gkp045.
230. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8. doi: S1046-2023(01)91262-9 [pii] 10.1006/meth.2001.1262.
231. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3(6):1101-8.
232. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 2003;339(1):62-6.
233. Tuomi JM, Voorbraak F, Jones DL, Ruijter JM. Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. *Methods* 2010;50(4):313-22. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.02.003.
234. World Health Organization. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl* 2006;450:76-85.
235. Moskal A, Pisa PT, Ferrari P, Byrnes G, Freisling H, Boutron-Ruault MC, Cadeau C, Nailler L, Wendt A, Kühn T, et al. Nutrient patterns and their food sources in an International Study Setting: report from the EPIC study. *PLoS One* 2014;9(6):e98647. doi: 10.1371/journal.pone.0098647.
236. Northstone K, Ness AR, Emmett PM, Rogers IS. Adjusting for energy intake in dietary pattern investigations using principal components analysis. *Eur J Clin Nutr* 2008;62(7):931-8. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602789.
237. Romaguera D, Bamia C, Pons A, Tur JA, Trichopoulou A. Food patterns and Mediterranean diet in western and eastern Mediterranean islands. *Public Health Nutr* 2009;12(8):1174-81. doi: 10.1017/S1368980008003674.
238. Martínez-González MA, Zazpe I, Razquin C, Sánchez-Tainta A, Corella D, Salas-Salvadó J, Toledo E, Ros E, Muñoz MA, Recondo J, et al. Empirically-derived food patterns and the risk of total mortality and cardiovascular events in the PREDIMED study. *Clin Nutr* 2014;34(5):859-67. doi: 10.1016/j.clnu.2014.09.006.
239. Hu Lt, Bentler PM. Cutoff criteria for fit indexes in covariance structure analysis: Conventional criteria versus new alternatives. *Structural Equation Modeling: A Multidisciplinary Journal* 1999;6:55. doi: 10.1080/10705519909540118.

240. Ehrenberg HM, Durnwald CP, Catalano P, Mercer BM. The influence of obesity and diabetes on the risk of cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(3):969-74. doi: 10.1016/j.ajog.2004.06.057.
241. Maier JT, Schalinski E, Gauger U, Hellmeyer L. Antenatal body mass index (BMI) and weight gain in pregnancy - its association with pregnancy and birthing complications. *J Perinat Med* 2016;44(4):397-404. doi: 10.1515/jpm-2015-0172.
242. Monterrosa EC, Frongillo EA, Neufeld LM, Egan KA, Ramakrishnan U, Rasmussen KM. Maternal pre-pregnancy body mass index is not associated with infant and young child feeding in low-income Mexican children 1-24 months old. *Matern Child Nutr* 2015;11(2):215-28. doi: 10.1111/j.1740-8709.2012.00461.x.
243. Zhang YQ, Li H. Changes in weight, length, head circumference, and ponderal index at birth of healthy term newborns in nine cities in China during the period of rapid social development 1985-2005. *Econ Hum Biol* 2015;19:45-50. doi: 10.1016/j.ehb.2015.07.003.
244. Lahmann PH, Wills RA, Coory M. Trends in birth size and macrosomia in Queensland, Australia, from 1988 to 2005. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2009;23(6):533-41. doi: 10.1111/j.1365-3016.2009.01075.x.
245. Schack-Nielsen L, Mølgaard C, Sørensen TI, Greisen G, Michaelsen KF. Secular change in size at birth from 1973 to 2003: national data from Denmark. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14(7):1257-63. doi: 10.1038/oby.2006.143.
246. Lande B, Andersen LF, Henriksen T, Baerug A, Johansson L, Trygg KU, Bjørneboe GE, Veierød MB. Relations between high ponderal index at birth, feeding practices and body mass index in infancy. *Eur J Clin Nutr* 2005;59(11):1241-9. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602235.
247. Carling SJ, Demment MM, Kjolhede CL, Olson CM. Breastfeeding duration and weight gain trajectory in infancy. *Pediatrics* 2015;135(1):111-9. doi: 10.1542/peds.2014-1392.
248. King K, Murphy S, Hoyo C. Epigenetic regulation of Newborns' imprinted genes related to gestational growth: patterning by parental race/ethnicity and maternal socioeconomic status. *J Epidemiol Community Health* 2015;59(11):1241-9. doi: 10.1136/jech-2014-204781.
249. Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)*. Washington DC; 2005:1357.
250. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). *Scientific Opinion on Dietary Reference Values for energy*. Parma, Italy; 2013:112.
251. Cucó G, Fernández-Ballart J, Sala J, Viladrich C, Iranzo R, Vila J, Arija V. Dietary patterns and associated lifestyles in preconception, pregnancy and postpartum. *Eur J Clin Nutr* 2006;60(3):364-71. doi: 1602324 [pii] 10.1038/sj.ejcn.1602324.
252. Ortiz-Andrellucchi A, Sánchez-Villegas A, Ramírez-García O, Serra-Majem L. Assessment of nutritional quality in healthy pregnant women of the Canary Islands, Spain. *Med Clin (Barc)* 2009;133(16):615-21. doi: 10.1016/j.medcli.2009.06.012.
253. Sánchez CL, Rodríguez AB, Sánchez J, González R, Rivero M, Barriga C, Cubero J. Calcium intake nutritional status in breastfeeding women. *Arch Latinoam Nutr* 2008;58(4):371-6.
254. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). *Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre*. Parma, Italy; 2010:77.
255. Organización Mundial de la Salud. *Nota informativa sobre la ingesta de azúcares recomendada en la directriz de la OMS para adultos y niños*. Suiza; 2015.
256. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). *Scientific Opinion on Dietary Reference Values for water*. Parma, Italy; 2010:48.
257. Tur JA, Romaguera D, Pons A. Adherence to the Mediterranean dietary pattern among the population of the Balearic Islands. *Br J Nutr* 2004;92(3):341-6.

258. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Evaluación Nutricional de la Dieta Española I. Energía y Macronutrientes sobre datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE) 2011.
259. Bondia-Pons I, Mayneris-Perxachs J, Serra-Majem L, Castellote AI, Mariné A, López-Sabater MC. Diet quality of a population sample from coastal north-east Spain evaluated by a Mediterranean adaptation of the diet quality index (DQI). *Public Health Nutr* 2010;13(1):12-24. doi: 10.1017/S1368980009990231.
260. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. Parma, Italy; 2012:66.
261. Wu G. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids* 2013;45(3):407-11. doi: 10.1007/s00726-013-1500-6.
262. Fernstrom JD. Large neutral amino acids: dietary effects on brain neurochemistry and function. *Amino Acids* 2013;45(3):419-30. doi: 10.1007/s00726-012-1330-y.
263. Westerterp-Plantenga MS, Nieuwenhuizen A, Tomé D, Soenen S, Westerterp KR. Dietary protein, weight loss, and weight maintenance. *Annu Rev Nutr* 2009;29:21-41. doi: 10.1146/annurev-nutr-080508-141056.
264. She P, Van Horn C, Reid T, Hutson SM, Cooney RN, Lynch CJ. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293(6):E1552-63. doi: 10.1152/ajpendo.00134.2007.
265. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. Parma, Italy; 2010:107.
266. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. Washington D.C., United States of America; 2005:1331.
267. Simopoulos AP. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients* 2016;8(3):128. doi: 10.3390/nu8030128.
268. Carbajal Á, Pinto JA. La dieta equilibrada, prudente o saludable (Vol. 1). Colección Nutrición y Salud. Servicio de Promoción de la Salud. Instituto de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid, 2003.
269. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for folate. Parma, Italy; 2014:59.
270. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington D.C., United States of America; 1998.
271. Lamers Y. Folate recommendations for pregnancy, lactation, and infancy. *Ann Nutr Metab* 2011;59(1):32-7. doi: 10.1159/000332073.
272. Vujkovic M, Steegers EA, Looman CW, Ocké MC, van der Spek PJ, Steegers-Theunissen RP. The maternal Mediterranean dietary pattern is associated with a reduced risk of spina bifida in the offspring. *BJOG* 2009;116(3):408-15. doi: 10.1111/j.1471-0528.2008.01963.x.
273. Winkels RM, Brouwer IA, Siebelink E, Katan MB, Verhoef P. Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid. *Am J Clin Nutr* 2007;85(2):465-73.
274. Pannu PK, Calton EK, Soares MJ. Calcium and Vitamin D in Obesity and Related Chronic Disease. *Adv Food Nutr Res* 2016;77:57-100. doi: 10.1016/bs.afnr.2015.11.001.
275. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington D.C., United States of America; 2010.
276. Ross A, Manson J, Abrams S, Aloia J, Brannon P, Clinton S, Durazo-Arvizu R, Gallagher J, Gallo R, Jones G, et al. The 2011 Report on Dietary Reference Intakes

- for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 2011;96:53-8.
277. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin D. Parma, Italy; 2016:179.
 278. Agencia Estatal de Meteorología de España. Atlas climático ibérico. Temperatura del aire y precipitación (1971-2000), 2011.
 279. World Health Organization. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. 2nd edition. Bangkok, Thailand, 2004:341.
 280. Azcona AC. Nutrición y Dietética. Tema 2. Ingestas recomendadas de energía y nutrientes. Universidad de León: Secretariado de Publicaciones y Medios Audiovisuales, 2013:27-47.
 281. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin E as α -tocopherol. Parma, Italy; 2015:72.
 282. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamins C, E, selenium and carotenoids. Washington D.C., United States of America; 2000.
 283. Chun OK, Floegel A, Chung SJ, Chung CE, Song WO, Koo SI. Estimation of antioxidant intakes from diet and supplements in U.S. adults. *J Nutr* 2010;140(2):317-24. doi: 10.3945/jn.109.114413.
 284. Lima MS, Dimenstein R, Ribeiro KD. Vitamin E concentration in human milk and associated factors: a literature review. *J Pediatr (Rio J)* 2014;90(5):440-8. doi: 10.1016/j.jped.2014.04.006.
 285. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for niacin. Parma, Italy; 2014:42.
 286. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for pantothenic acid. Parma, Italy; 2014:25.
 287. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for biotin. Parma, Italy; 2014:24.
 288. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin A. Parma, Italy; 2015:84.
 289. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington DC: National academy press, 2000.
 290. Oliveira JM, Allert R, East CE. Vitamin A supplementation for postpartum women. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;3:CD005944. doi: 10.1002/14651858.CD005944.pub3.
 291. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for cobalamin (vitamin B12). Parma, Italy; 2015:64.
 292. Brito A, Hertrampf E, Olivares M, Gaitán D, Sánchez H, Allen LH, Uauy R. Folate, vitamin B12 and human health. *Rev Med Chil* 2012;140(11):1464-75. doi: 10.4067/S0034-98872012001100014.
 293. Molloy AM, Kirke PN, Brody LC, Scott JM, Mills JL. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr Bull* 2008;29(2 Suppl):S101-11; discussion S12-5.
 294. Greibe E, Andreasen BH, Lildballe DL, Morkbak AL, Hvas AM, Nexø E. Uptake of cobalamin and markers of cobalamin status: a longitudinal study of healthy pregnant women. *Clin Chem Lab Med* 2011;49(11):1877-82. doi: 10.1515/CCLM.2011.682.

295. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for calcium. Parma, Italy; 2015:82.
296. Pereira PC. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* 2014;30(6):619-27. doi: 10.1016/j.nut.2013.10.011.
297. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Tolerable upper intake levels. Parma, Italy; 2006.
298. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for zinc. Parma, Italy; 2014:76.
299. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington DC: National academy press, 1997.
300. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for magnesium. Parma, Italy; 2015:63.
301. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iodine. Parma, Italy; 2014:57.
302. Murcia M, Rebagliato M, Espada M, Vioque J, Santa Marina L, Alvarez-Pedrerol M, Lopez-Espinosa MJ, León G, Iñiguez C, Basterrechea M, et al. Iodine intake in a population of pregnant women: INMA mother and child cohort study, Spain. *J Epidemiol Community Health* 2010;64(12):1094-9. doi: 10.1136/jech.2009.092593.
303. Suárez Rodríguez M, Azcona San Julián C, Alzina de Aguilar V. Iodine intake during pregnancy: effects on thyroid function in mother and child. *Endocrinol Nutr* 2013;60(7):352-7. doi: 10.1016/j.endonu.2013.01.010.
304. Council on Environmental Health, Rogan WJ, Paulson JA, Baum C, Brock-Utne AC, Brumberg HL, Campbell CC, Lanphear BP, Lowry JA, Osterhoudt KC, Sandel MT, Spanier A, Trasande L. Iodine Deficiency, Pollutant Chemicals, and the Thyroid: New Information on an Old Problem. *Pediatrics* 2014;133(6):1163-6. doi: 10.1542/peds.2014-0900.
305. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate. Washington D.C.: National Academies Press, 2004.
306. Gray C, Al-Dujaili EA, Sparrow AJ, Gardiner SM, Craigon J, Welham SJ, Gardner DS. Excess maternal salt intake produces sex-specific hypertension in offspring: putative roles for kidney and gastrointestinal sodium handling. *PLoS One* 2013;8(8):e72682. doi: 10.1371/journal.pone.0072682.
307. Gray C, Long S, Green C, Gardiner SM, Craigon J, Gardner DS. Maternal fructose and/or salt intake and reproductive outcome in the rat: effects on growth, fertility, sex ratio, and birth order. *Biol Reprod* 2013;89(3):51. doi: 10.1095/biolreprod.113.109595.
308. Tay S, Blache D, Gregg K, Revell D. Consumption of a high-salt diet by ewes during pregnancy alters nephrogenesis in 5-month-old offspring. *Animal* 2012;6(11):1803-10. doi: 10.1017/S1751731112000584.
309. Lv J, Zhang P, Zhang Y, Kuang H, Cao L, Wu C, Jiang L, Li D, Mao C, Xu Z. Maternal high-salt intake during pregnancy reprogrammed renin-angiotensin system-mediated cardiomyocyte apoptosis in the adult offspring heart. *Reprod Sci* 2014;21(1):52-62. doi: 10.1177/1933719113488447.
310. Verd S, Nadal-Amat J, Gich I, Leshem M. Salt preference of nursing mothers is associated with earlier cessation of exclusive breastfeeding. *Appetite* 2010;54(1):233-6. doi: 10.1016/j.appet.2009.12.006.
311. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iron. Parma, Italy; 2015:115.
312. World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005. 2008.

313. McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr* 2009;12(4):444-54. doi: 10.1017/S1368980008002401.
314. Mello-Neto J, Rondó PH, Oshiiwa M, Morgano MA, Zacari CZ, dos Santos ML. Iron supplementation in pregnancy and breastfeeding and iron, copper and zinc status of lactating women from a human milk bank. *J Trop Pediatr* 2013;59(2):140-4. doi: 10.1093/tropej/fms055.
315. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for phosphorus. Parma, Italy; 2015:54.
316. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to plant sterols and plant stanols and maintenance of normal blood cholesterol concentrations, and maintenance of normal prostate size and normal urination pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. Parma, Italy; 2010:22.
317. Ras RT, van der Schouw YT, Trautwein EA, Sioen I, Dalmeijer GW, Zock PL, Beulens JW. Intake of phytosterols from natural sources and risk of cardiovascular disease in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-the Netherlands (EPIC-NL) population. *Eur J Prev Cardiol* 2015;22(8):1067-75. doi: 10.1177/2047487314554864.
318. Willems JI, Blommaert MA, Trautwein EA. Results from a post-launch monitoring survey on consumer purchases of foods with added phytosterols in five European countries. *Food Chem Toxicol* 2013;62C:48-53. doi: 10.1016/j.fct.2013.08.021.
319. D'Andrea G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* 2015;106:256-71. doi: 10.1016/j.fitote.2015.09.018.
320. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to quercetin and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage, “cardiovascular system”, “mental state and performance”, and “liver, kidneys” pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. Parma, Italy; 2011:15.
321. Nöthlings U, Murphy SP, Wilkens LR, Boeing H, Schulze MB, Bueno-de-Mesquita HB, Michaud DS, Roddam A, Rohrmann S, Tjønneland A, et al. A food pattern that is predictive of flavonol intake and risk of pancreatic cancer. *Am J Clin Nutr* 2008;88(6):1653-62. doi: 10.3945/ajcn.2008.26398.
322. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to caffeine and increased fat oxidation leading to a reduction in body fat mass, increased energy expenditure leading to a reduction in body weight, increased alertness and increased attention pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. Parma, Italy; 2011:29.
323. Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci* 2010;75(3):R77-87. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x.
324. Berends LM, van der Velpen V, Cassidy A. Flavan-3-ols, theobromine, and the effects of cocoa and chocolate on cardiometabolic risk factors. *Curr Opin Lipidol* 2015;26(1):10-9. doi: 10.1097/MOL.0000000000000144.
325. Martínez-Pinilla E, Oñatibia-Astibia A, Franco R. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Front Pharmacol* 2015;6:30. doi: 10.3389/fphar.2015.00030.
326. Kerimi A, Williamson G. The cardiovascular benefits of dark chocolate. *Vascul Pharmacol* 2015;71:11-5. doi: 10.1016/j.vph.2015.05.011.
327. Garcia-Aloy M, Llorach R, Urpi-Sarda M, Jáuregui O, Corella D, Ruiz-Canela M, Salas-Salvadó J, Fitó M, Ros E, Estruch R, et al. A metabolomics-driven approach to predict cocoa product consumption by designing a multimetabolite biomarker model in

- free-living subjects from the PREDIMED study. *Mol Nutr Food Res* 2015;59(2):212-20. doi: 10.1002/mnfr.201400434.
328. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to soy phosphatidyl choline and maintenance of normal blood cholesterol concentrations, contribution to normal fat metabolism, increase in the intestinal absorption of glutamine, faster recovery from muscle fatigue after exercise, improvement of neuromuscular function, contribution to normal cognitive function and maintenance of normal neurological function pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. Parma, Italy; 2010:26.
 329. Fischer LM, da Costa KA, Galanko J, Sha W, Stephenson B, Vick J, Zeisel SH. Choline intake and genetic polymorphisms influence choline metabolite concentrations in human breast milk and plasma. *Am J Clin Nutr* 2010;92(2):336-46. doi: 10.3945/ajcn.2010.29459.
 330. West AA, Yan J, Jiang X, Perry CA, Innis SM, Caudill MA. Choline intake influences phosphatidylcholine DHA enrichment in nonpregnant women but not in pregnant women in the third trimester. *Am J Clin Nutr* 2013;97(4):718-27. doi: 10.3945/ajcn.112.050211.
 331. Lewis ED, Subhan FB, Bell RC, McCargar LJ, Curtis JM, Jacobs RL, Field CJ, team A. Estimation of choline intake from 24 h dietary intake recalls and contribution of egg and milk consumption to intake among pregnant and lactating women in Alberta. *Br J Nutr* 2014;112(1):112-21. doi: 10.1017/S0007114514000555.
 332. Cordero P, Gonzalez-Muniesa P, Milagro FI, Campion J, Martinez JA. Perinatal maternal feeding with an energy dense diet and/or micronutrient mixture drives offspring fat distribution depending on the sex and growth stage. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2014;99(5):834-40. doi: 10.1111/jpn.12283.
 333. Silva EO, Bracarense AP. Phytic Acid: From Antinutritional to Multiple Protection Factor of Organic Systems. *J Food Sci* 2016;81(6):R1357-62. doi: 10.1111/1750-3841.13320.
 334. Grases F, Saez-Torres C, Rodriguez A, Costa-Bauza A, Rodrigo D, Frontera G, Berga F, Fakier S. Urinary phytate (Myo-inositol hexaphosphate) in healthy school children and risk of nephrolithiasis. *J Ren Nutr* 2014;24(4):219-23. doi: 10.1053/j.jrn.2014.03.004.
 335. Prieto RM, Fiol M, Perello J, Estruch R, Ros E, Sanchis P, Grases F. Effects of Mediterranean diets with low and high proportions of phytate-rich foods on the urinary phytate excretion. *Eur J Nutr* 2010;49(6):321-6. doi: 10.1007/s00394-009-0087-x.
 336. Mäkelä J, Linderborg K, Niinikoski H, Yang B, Lagström H. Breast milk fatty acid composition differs between overweight and normal weight women: the STEPS Study. *Eur J Nutr* 2013;52(2):727-35. doi: 10.1007/s00394-012-0378-5.
 337. Wojcik KY, Rechtman DJ, Lee ML, Montoya A, Medo ET. Macronutrient analysis of a nationwide sample of donor breast milk. *J Am Diet Assoc* 2009;109(1):137-40. doi: 10.1016/j.jada.2008.10.008.
 338. Gidrewicz DA, Fenton TR. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatr* 2014;14:216. doi: 10.1186/1471-2431-14-216.
 339. Moltó-Puigmartí C, Castellote AI, Carbonell-Estrany X, López-Sabater MC. Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clin Nutr* 2011;30(1):116-23. doi: 10.1016/j.clnu.2010.07.013.
 340. Koletzko B, Agostoni C, Bergmann R, Ritzenthaler K, Shamir R. Physiological aspects of human milk lipids and implications for infant feeding: a workshop report. *Acta Paediatr* 2011;100(11):1405-15. doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02343.x.
 341. Grote V, Verduci E, Scaglioni S, Vecchi F, Contarini G, Giovannini M, Koletzko B, Agostoni C. Breast milk composition and infant nutrient intakes during the first 12 months of life. *Eur J Clin Nutr* 2015;70(2):250-6. doi: 10.1038/ejcn.2015.162.

342. Stam J, Sauer PJ, Boehm G. Can we define an infant's need from the composition of human milk? *Am J Clin Nutr* 2013;98(2):521S-8S. doi: 10.3945/ajcn.112.044370.
343. Antonakou A, Skenderi KP, Chiou A, Anastasiou CA, Bakoula C, Matalas 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):963-73. doi: 10.1007/s00394-012-0403-8.
344. Andreas NJ, Hyde MJ, Gomez-Romero M, Lopez-Gonzalvez MA, Villaseñor A, Wijeyesekera A, Barbas C, Modi N, Holmes E, Garcia-Perez I. Multiplatform characterization of dynamic changes in breast milk during lactation. *Electrophoresis* 2015. doi: 10.1002/elps.201500011.
345. Bauer J, Gerss J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clin Nutr* 2011;30(2):215-20. doi: 10.1016/j.clnu.2010.08.003.
346. Gungston FD, Harwood JL, Dijkstra AJ. *The lipid handbook*. 3rd edition ed. New York: CRC press, 2007.
347. Marangoni F, Agostoni C, Lammardo AM, Giovannini M, Galli C, Riva E. Polyunsaturated fatty acid concentrations in human hindmilk are stable throughout 12-months of lactation and provide a sustained intake to the infant during exclusive breastfeeding: an Italian study. *Br J Nutr* 2000;84(1):103-9.
348. López-López A, López-Sabater MC, Campoy-Folgozo C, Rivero-Urgell M, Castellote-Bargalló AI. Fatty acid and sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada (Spain) and in infant formulas. *Eur J Clin Nutr* 2002;56(12):1242-54. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601470.
349. Sala-Vila A, Castellote AI, Rodriguez-Palmero M, Campoy C, López-Sabater MC. Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): changes during lactation. *Nutrition* 2005;21(4):467-73. doi: 10.1016/j.nut.2004.08.020.
350. Ribeiro M, Balcao V, Guimaraes H, Rocha G, Moutinho C, Matos C, Almeida C, Casal S, Guerra A. Fatty acid profile of human milk of Portuguese lactating women: prospective study from the 1st to the 16th week of lactation. *Ann Nutr Metab* 2008;53(1):50-6. doi: 10.1159/000156597.
351. Smit EN, Martini IA, Kemperman RF, Schaafsma A, Muskiet FA, Boersma ER. Fatty acids in formulae for term infants: compliance of present recommendations with the actual human milk fatty acid composition of geographically different populations. *Acta Paediatr* 2003;92(7):790-6.
352. Ross AB, Svelander C, Savolainen OI, Lind MV, Kirwan JP, Breton I, Godin JP, Sandberg AS. A high-throughput method for liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of plasma alkylresorcinols, biomarkers of whole grain wheat and rye intake. *Anal Biochem* 2016;499:1-7. doi: 10.1016/j.ab.2015.12.023.
353. Kyrø C, Olsen A, Bueno-de-Mesquita HB, Skeie G, Loft S, Åman P, Leenders M, Dik VK, Siersema PD, Pischon T, et al. Plasma alkylresorcinol concentrations, biomarkers of whole-grain wheat and rye intake, in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Br J Nutr* 2014;111(10):1881-90. doi: 10.1017/S0007114513004388.
354. Wierzbicka R, Wu H, Franek M, Kamal-Eldin A, Landberg R. Determination of alkylresorcinols and their metabolites in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2015;1000:120-9. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.07.009.
355. Magnusdottir OK, Landberg R, Gunnarsdottir I, Cloetens L, Åkesson B, Rosqvist F, Schwab U, Herzig KH, Hukkanen J, Savolainen MJ, et al. Whole grain rye intake, reflected by a biomarker, is associated with favorable blood lipid outcomes in subjects with the metabolic syndrome--a randomized study. *PLoS One* 2014;9(10):e110827. doi: 10.1371/journal.pone.0110827.
356. Magnusdottir OK, Landberg R, Gunnarsdottir I, Cloetens L, Åkesson B, Landin-Olsson M, Rosqvist F, Iggman D, Schwab U, Herzig KH, et al. Plasma alkylresorcinols C17:0/C21:0 ratio, a biomarker of relative whole-grain rye intake, is associated to

- insulin sensitivity: a randomized study. *Eur J Clin Nutr* 2014;68(4):453-8. doi: 10.1038/ejcn.2014.12.
357. Bolognini Pereira K, de Azeredo VB, Barros da Sileira C, Pedruzzi LM. Composition of breast milk of lactating adolescents in function of time of lactation. *Nutr Hosp* 2013;28(6):1971-6. doi: 10.3305/nutr_hosp.v28in06.6909.
 358. García-Lara NR, Escuder-Vieco D, García-Algar O, De la Cruz J, Lora D, Pallás-Alonso C. Effect of freezing time on macronutrients and energy content of breastmilk. *Breastfeed Med* 2012;7:295-301. doi: 10.1089/bfm.2011.0079.
 359. Silvestre D, Fraga M, Gormaz M, Torres E, Vento M. Comparison of mid-infrared transmission spectroscopy with biochemical methods for the determination of macronutrients in human milk. *Matern Child Nutr* 2014;10(3):373-82. doi: 10.1111/j.1740-8709.2012.00431.x.
 360. Sánchez López CL, Hernández A, Rodríguez AB, Rivero M, Barriga C, Cubero J. Nitrogen and protein content analysis of human milk, diurnality vs nocturnality. *Nutr Hosp* 2011;26(3):511-4. doi: 10.1590/S0212-16112011000300012.
 361. Fujimori M, França EL, Fiorin V, Morais TC, Honorio-França AC, de Abreu LC. Changes in the biochemical and immunological components of serum and colostrum of overweight and obese mothers. *BMC Pregnancy Childbirth* 2015;15:166. doi: 10.1186/s12884-015-0574-4.
 362. Quinn EA. No evidence for sex biases in milk macronutrients, energy, or breastfeeding frequency in a sample of Filipino mothers. *Am J Phys Anthropol* 2013;152(2):209-16. doi: 10.1002/ajpa.22346.
 363. Hsu YC, Chen CH, Lin MC, Tsai CR, Liang JT, Wang TM. Changes in preterm breast milk nutrient content in the first month. *Pediatr Neonatol* 2014;55(6):449-54. doi: 10.1016/j.pedneo.2014.03.002.
 364. Mehta R, Petrova A. Biologically active breast milk proteins in association with very preterm delivery and stage of lactation. *J Perinatol* 2011;31(1):58-62. doi: jp201068 [pii] 10.1038/jp.2010.68.
 365. Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM. The possible role of antimicrobial proteins in obesity-associated immunologic alterations. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10(7):855-66. doi: 10.1586/1744666X.2014.911088.
 366. Bronsky J, Mitrova K, Karpisek M, Mazoch J, Durilova M, Fisarkova B, Stechova K, Prusa R, Nevoral J. Adiponectin, AFABP, and leptin in human breast milk during 12 months of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;52(4):474-7. doi: 10.1097/MPG.0b013e3182062fcc.
 367. Savino F, Liguori SA, Lupica MM. Adipokines in breast milk and preterm infants. *Early Hum Dev* 2010;86 Suppl 1:77-80. doi: S0378-3782(10)00013-7 [pii] 10.1016/j.earlhumdev.2010.01.011.
 368. Weyermann M, Beermann C, Brenner H, Rothenbacher D. Adiponectin and leptin in maternal serum, cord blood, and breast milk. *Clin Chem* 2006;52(11):2095-102. doi: 10.1373/clinchem.2006.071019.
 369. Savino F, Liguori SA, Petrucci E, Lupica MM, Fissore MF, Oggero R, Silvestro L. Evaluation of leptin in breast milk, lactating mothers and their infants. *Eur J Clin Nutr* 2010;64(9):972-7. doi: ejcn2010105 [pii] 10.1038/ejcn.2010.105.
 370. Ho SP, Wang LJ, Cheng I, Chen YL, Sung TC, Jow GM, Mu SC. Association of plasma leptin levels with maternal body weight and body mass index in premature and term newborns. *Pediatr Neonatol* 2010;51(1):19-25. doi: S1875-9572(10)60005-8 [pii] 10.1016/S1875-9572(10)60005-8.
 371. Eilers E, Ziska T, Harder T, Plogemann A, Obladen M, Loui A. Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants. *Early Hum Dev* 2011;87(6):415-9. doi: S0378-3782(11)00145-9 [pii] 10.1016/j.earlhumdev.2011.03.004.
 372. Savino F, Costamagna M, Prino A, Oggero R, Silvestro L. Leptin levels in breast-fed and formula-fed infants. *Acta Paediatr* 2002;91(9):897-902.

373. Savino F, Fissore MF, Grassino EC, Nanni GE, Oggero R, Silvestro L. Ghrelin, leptin and IGF-I levels in breast-fed and formula-fed infants in the first years of life. *Acta Paediatr* 2005;94(5):531-7. doi: 10.1080/08035250510027642.
374. Weyermann M, Brenner H, Rothenbacher D. Adipokines in human milk and risk of overweight in early childhood: a prospective cohort study. *Epidemiology* 2007;18(6):722-9.
375. Tung WK, Lin SJ, Hwang YS, Wu CM, Wang YH, Tsai WH. Association of cord plasma leptin with birth size in term newborns. *Pediatr Neonatol* 2009;50(6):255-60. doi: S1875-9572(09)60073-5 [pii] 10.1016/S1875-9572(09)60073-5.
376. Fields DA, Demerath EW. Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF- α in human breast milk with infant growth and body composition. *Pediatr Obes* 2012;7(4):304-12. doi: 10.1111/j.2047-6310.2012.00059.x.
377. Newburg DS, Woo JG, Morrow AL. Characteristics and potential functions of human milk adiponectin. *J Pediatr* 2010;156(2 Suppl):S41-6. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.11.020.
378. Martin LJ, Woo JG, Geraghty SR, Altaye M, Davidson BS, Banach W, Dolan LM, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. *Am J Clin Nutr* 2006;83(5):1106-11.
379. Woo JG, Guerrero ML, Altaye M, Ruiz-Palacios GM, Martin LJ, Dubert-Ferrandon A, Newburg DS, Morrow AL. Human milk adiponectin is associated with infant growth in two independent cohorts. *Breastfeed Med* 2009;4(2):101-9. doi: 10.1089/bfm.2008.0137.
380. Agostoni C, Carratù B, Boniglia C, Lammardo AM, Riva E, Sanzini E. Free glutamine and glutamic acid increase in human milk through a three-month lactation period. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31(5):508-12.
381. Baldeón ME, Mennella JA, Flores N, Fornasini M, San Gabriel A. Free amino acid content in breast milk of adolescent and adult mothers in Ecuador. *Springerplus* 2014;3:104. doi: 10.1186/2193-1801-3-104.
382. Ramirez I, DeSantiago S, Tovar AR, Torres N. Amino acid intake during lactation and amino acids of plasma and human milk. *Adv Exp Med Biol* 2001;501:415-21.
383. Spevacek AR, Smilowitz JT, Chin EL, Underwood MA, German JB, Slupsky CM. Infant Maturity at Birth Reveals Minor Differences in the Maternal Milk Metabolome in the First Month of Lactation. *J Nutr* 2015;145(8):1698-708. doi: 10.3945/jn.115.210252.
384. Zhang Z, Adelman AS, Rai D, Boettcher J, Lönnerdal B. Amino acid profiles in term and preterm human milk through lactation: a systematic review. *Nutrients* 2013;5(12):4800-21. doi: 10.3390/nu5124800.
385. Jochum F, Colling S, Meinardus P, Altheld B, Stehle P, Fusch C. Total glutamine content in human milk is not influenced by gestational age. *Acta Paediatr* 2006;95(8):985-90. doi: 10.1080/08035250600729100.
386. de Groof F, Huang L, van Vliet I, Voortman GJ, Schierbeek H, Roksnoer LC, Vermes A, Chen C, Huang Y, van Goudoever JB. Branched-chain amino acid requirements for enterally fed term neonates in the first month of life. *Am J Clin Nutr* 2014;99(1):62-70. doi: 10.3945/ajcn.112.038927.
387. Sasaki T, Matsui S, Kitamura T. Control of Appetite and Food Preference by NMDA Receptor and Its Co-Agonist d-Serine. *Int J Mol Sci* 2016;17(7). doi: 10.3390/ijms17071081.
388. Michaelsen KF, Greer FR. Protein needs early in life and long-term health. *Am J Clin Nutr* 2014;99(3):718S-22S. doi: 10.3945/ajcn.113.072603.
389. Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, Powell C, Vedantam S, Buchkovich ML, Yang J, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 2015;518(7538):197-206. doi: 10.1038/nature14177.
390. Manjarin R, Bequette BJ, Wu G, Trottier NL. Linking our understanding of mammary gland metabolism to amino acid nutrition. *Amino Acids* 2014;46(11):2447-62. doi: 10.1007/s00726-014-1818-8.

391. Averett SL, Fletcher EK. Prepregnancy Obesity and Birth Outcomes. *Matern Child Health J* 2016;20(3):655-64. doi: 10.1007/s10995-015-1865-0.
392. Panel on Dietetic Products Nutrition and allergies from the European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on nutrient requirements and dietary intakes of infants and young children in the European Union. Parma, Italy; 2013:103.
393. Maalouf J, Cogswell ME, Yuan K, Martin C, Gunn JP, Pehrsson P, Merritt R, Bowman B. Top sources of dietary sodium from birth to age 24 mo, United States, 2003-2010. *Am J Clin Nutr* 2015;101(5):1021-8. doi: 10.3945/ajcn.114.099770.
394. Manganaro R, Marseglia L, Mami C, Palmara A, Paolata A, Loddo S, Gargano R, Mondello M, Gemelli M. Breast milk sodium concentration, sodium intake and weight loss in breast-feeding newborn infants. *Br J Nutr* 2007;97(2):344-8. doi: 10.1017/S0007114507280572.
395. Galipeau R, Goulet C, Chagnon M. Infant and maternal factors influencing breastmilk sodium among primiparous mothers. *Breastfeed Med* 2012;7:290-4. doi: 10.1089/bfm.2011.0022.
396. Dutta S, Saini S, Prasad R. Changes in preterm human milk composition with particular reference to introduction of mixed feeding. *Indian Pediatr* 2014;51(12):997-9.
397. Tudehope DI. Human milk and the nutritional needs of preterm infants. *J Pediatr* 2013;162(3 Suppl):S17-25. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.11.049.
398. Lips P, van Schoor NM, de Jongh RT. Diet, sun, and lifestyle as determinants of vitamin D status. *Ann N Y Acad Sci* 2014;1317:92-8. doi: 10.1111/nyas.12443.
399. Robinson SM, Crozier SR, Harvey NC, Barton BD, Law CM, Godfrey KM, Cooper C, Inskip HM. Modifiable early-life risk factors for childhood adiposity and overweight: an analysis of their combined impact and potential for prevention. *Am J Clin Nutr* 2015;101(2):368-75. doi: 10.3945/ajcn.114.094268.
400. Minet JC, Bissé E, Aebischer CP, Beil A, Wieland H, Lüschtg J. Assessment of vitamin B-12, folate, and vitamin B-6 status and relation to sulfur amino acid metabolism in neonates. *Am J Clin Nutr* 2000;72(3):751-7.
401. Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab* 2011;14(4):528-36. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.014.
402. Choi SE, Fu T, Seok S, Kim DH, Yu E, Lee KW, Kang Y, Li X, Kemper B, Kemper JK. Elevated microRNA-34a in obesity reduces NAD+ levels and SIRT1 activity by directly targeting NAMPT. *Aging Cell* 2013;12(6):1062-72. doi: 10.1111/accel.12135.
403. Yang SJ, Choi JM, Kim L, Park SE, Rhee EJ, Lee WY, Oh KW, Park SW, Park CY. Nicotinamide improves glucose metabolism and affects the hepatic NAD-sirtuin pathway in a rodent model of obesity and type 2 diabetes. *J Nutr Biochem* 2014;25(1):66-72. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.004.
404. Chi Y, Sauve AA. Nicotinamide riboside, a trace nutrient in foods, is a vitamin B3 with effects on energy metabolism and neuroprotection. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013;16(6):657-61. doi: 10.1097/MCO.0b013e32836510c0.
405. Kraus D, Yang Q, Kong D, Banks AS, Zhang L, Rodgers JT, Pirinen E, Pulini Kunnil TC, Gong F, Wang YC, et al. Nicotinamide N-methyltransferase knockdown protects against diet-induced obesity. *Nature* 2014;508(7495):258-62. doi: 10.1038/nature13198.
406. Li D, Tian YJ, Guo J, Sun WP, Lun YZ, Guo M, Luo N, Cao Y, Cao JM, Gong XJ, et al. Nicotinamide supplementation induces detrimental metabolic and epigenetic changes in developing rats. *Br J Nutr* 2013;110(12):2156-64. doi: 10.1017/S0007114513001815.
407. Garten A, Schuster S, Penke M, Gorski T, de Giorgis T, Kiess W. Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11(9):535-46. doi: 10.1038/nrendo.2015.117.
408. Cantó C, Houtkooper RH, Pirinen E, Youn DY, Oosterveer MH, Cen Y, Fernandez-Marcos PJ, Yamamoto H, Andreux PA, Cettour-Rose P, et al. The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab* 2012;15(6):838-47. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.022.

409. Brunetti L, Recinella L, Di Nisio C, Chiavaroli A, Leone S, Ferrante C, Orlando G, Vacca M. Effects of visfatin/PBEF/NAMPT on feeding behaviour and hypothalamic neuromodulators in the rat. *J Biol Regul Homeost Agents* 2012;26(2):295-302.
410. Cline MA, Nandar W, Prall BC, Bowden CN, Denbow DM. Central visfatin causes orexigenic effects in chicks. *Behav Brain Res* 2008;186(2):293-7. doi: 10.1016/j.bbr.2007.08.016.
411. Chang YH, Chang DM, Lin KC, Shin SJ, Lee YJ. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27(6):515-27. doi: 10.1002/dmrr.1201.
412. Tsai PJ, Davis J, Thompson K, Bryant-Greenwood G. Visfatin/Nampt and SIRT1: Roles in Postterm Delivery in Pregnancies Associated With Obesity. *Reprod Sci* 2015;22(8):1028-36. doi: 10.1177/1933719115570908.
413. Bienertová-Vašků J, Bienert P, Zlámál F, Tomandl J, Tomandlová M, Dostálová Z, Vašků A. Visfatin is secreted into the breast milk and is correlated with weight changes of the infant after the birth. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;96(3):355-61. doi: 10.1016/j.diabres.2011.06.009.
414. Ren XN, Yin SA, Yang ZY, Yang XG, Shao B, Ren YP, Zhang J. Application of UPLC-MS/MS Method for Analyzing B-vitamins in Human Milk. *Biomed Environ Sci* 2015;28(10):738-50. doi: 10.3967/bes2015.104.
415. Ren X, Yang Z, Shao B, Yin SA, Yang X. B-Vitamin Levels in Human Milk among Different Lactation Stages and Areas in China. *PLoS One* 2015;10(7):e0133285. doi: 10.1371/journal.pone.0133285.
416. Bieganowski P, Brenner C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell* 2004;117(4):495-502.
417. Lee HJ, Hong YS, Jun W, Yang SJ. Nicotinamide Riboside Ameliorates Hepatic Metaflammation by Modulating NLRP3 Inflammasome in a Rodent Model of Type 2 Diabetes. *J Med Food* 2015;18(11):1207-13. doi: 10.1089/jmf.2015.3439.
418. Alsaweed M, Hepworth AR, Lefèvre C, Hartmann PE, Geddes DT, Hassiotou F. Human Milk MicroRNA and Total RNA Differ Depending on Milk Fractionation. *J Cell Biochem* 2015;116(10):2397-407. doi: 10.1002/jcb.25207.
419. Xi Y, Jiang X, Li R, Chen M, Song W, Li X. The levels of human milk microRNAs and their association with maternal weight characteristics. *Eur J Clin Nutr* 2015;70(4):445-9. doi: 10.1038/ejcn.2015.168.
420. Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence* 2010;1(1):7. doi: 1758-907X-1-7 [pii] 10.1186/1758-907X-1-7.
421. Izumi H, Kosaka N, Shimizu T, Sekine K, Ochiya T, Takase M. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *J Dairy Sci* 2012;95(9):4831-41. doi: S0022-0302(12)00497-3 [pii] 10.3168/jds.2012-5489.
422. Abente EJ, Subramanian M, Ramachandran V, Najafi-Shoushtari SH. MicroRNAs in obesity-associated disorders. *Arch Biochem Biophys* 2015;589:108-19. doi: 10.1016/j.abb.2015.09.018.
423. Innis SM. Trans fatty intakes during pregnancy, infancy and early childhood. *Atheroscler Suppl* 2006;7(2):17-20. doi: S1567-5688(06)00029-8 [pii] 10.1016/j.atherosclerosissup.2006.04.005.
424. Bravi F, Wiens F, Decarli A, Dal Pont A, Agostoni C, Ferraroni M. Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2016;104(3):646-62. doi: 10.3945/ajcn.115.120881.
425. Novak EM, Innis SM. Dietary long chain n-3 fatty acids are more closely associated with protein than energy intakes from fat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2012;86(3):107-12. doi: 10.1016/j.plefa.2012.01.003.
426. Kirchberg FF, Harder U, Weber M, Grote V, Demmelmair H, Peissner W, Rzehak P, Xhonneux A, Carlier C, Ferre N, et al. Dietary protein intake affects amino acid and

- acylcarnitine metabolism in infants aged 6 months. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100(1):149-58. doi: 10.1210/jc.2014-3157.
427. Bassols J, Prats-Puig A, Gispert-Saüch M, Crehuet-Almirall M, Carreras-Badosa G, Díaz-Roldán F, Montesinos-Costa M, de Zegher F, Ibáñez L, López-Bermejo A. Increased serum IgG and IgA in overweight children relate to a less favourable metabolic phenotype. *Pediatr Obes* 2013;9(3):232-8. doi: 10.1111/j.2047-6310.2013.00160.x.
428. Wesseling S, Koeners MP, Joles JA. Salt sensitivity of blood pressure: developmental and sex-related effects. *Am J Clin Nutr* 2011;94(6 Suppl):1928S-32S. doi: 10.3945/ajcn.110.000901.
429. Priego T, Sánchez J, García AP, Palou A, Picó C. Maternal dietary fat affects milk fatty acid profile and impacts on weight gain and thermogenic capacity of suckling rats. *Lipids* 2013;48(5):481-95. doi: 10.1007/s11745-013-3764-8.
430. Parra P, Bruni G, Palou A, Serra F. Dietary calcium attenuation of body fat gain during high-fat feeding in mice. *J Nutr Biochem* 2008;19(2):109-17. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.01.009.
431. Pérez-Gallardo L, Gómez M, Parra P, Sánchez J, Palou A, Serra F. Effect of calcium-enriched high-fat diet on calcium, magnesium and zinc retention in mice. *Br J Nutr* 2009;101(10):1463-6. doi: 10.1017/S0007114508102446.
432. Laraichi S, Parra P, Zamanillo R, El Amarti A, Palou A, Serra F. Dietary Supplementation of Calcium may Counteract Obesity in Mice Mediated by Changes in Plasma Fatty Acids. *Lipids* 2013;48(8):817-26. doi: 10.1007/s11745-013-3798-y.
433. Chaplin A, Palou A, Serra F. Methylation analysis in fatty-acid-related genes reveals their plasticity associated with conjugated linoleic acid and calcium supplementation in adult mice. *Eur J Nutr* 2015. doi: 10.1007/s00394-015-1135-3.
434. Chaplin A, Palou A, Serra F. Body fat loss induced by calcium in co-supplementation with conjugated linoleic acid is associated with increased expression of bone formation genes in adult mice. *J Nutr Biochem* 2015;26(12):1540-6. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.07.025.
435. Chaplin A, Parra P, Laraichi S, Serra F, Palou A. Calcium supplementation modulates gut microbiota in a prebiotic manner in dietary obese mice. *Mol Nutr Food Res* 2016;60(2):468-80. doi: 10.1002/mnfr.201500480.
436. Astrup A. Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies. *Am J Clin Nutr* 2014;99(5 Suppl):1235S-42S. doi: 10.3945/ajcn.113.073015.
437. Buppasiri P, Lumbiganon P, Thinkhamrop J, Ngamjarus C, Laopaiboon M, Medley N. Calcium supplementation (other than for preventing or treating hypertension) for improving pregnancy and infant outcomes. *Cochrane Database Syst Rev* 2015(2):CD007079. doi: 10.1002/14651858.CD007079.pub3.
438. Cuervo M, Corbalán M, Baladía E, Cabrerizo L, Formiguera X, Iglesias C, Lorenzo H, Polanco I, Quiles J, Romero de Avila MD, et al. Comparison of dietary reference intakes (DRI) between different countries of the European Union, The United States and the World Health Organization. *Nutr Hosp* 2009;24(4):384-414. doi: S0212-16112009000400003 [pii].
439. Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, Opriessnig P, Papak C, Ailhaud G, Dani C, Amri EZ, Scheideler M. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390(2):247-51. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.098.
440. Kim SY, Kim AY, Lee HW, Son YH, Lee GY, Lee JW, Lee YS, Kim JB. miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPARgamma expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;392(3):323-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.012.
441. Villard A, Marchand L, Thivolet C, Rome S. Diagnostic Value of Cell-free Circulating MicroRNAs for Obesity and Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *J Mol Biomark Diagn* 2015;6(6). doi: 10.4172/2155-9929.1000251.

442. Pérez-Escamilla R, Kac G. Childhood obesity prevention: a life-course framework. *Int J Obes Suppl* 2013;3(Suppl 1):S3-S5. doi: 10.1038/ijosup.2013.2.
443. Gasbarrino K, Gorgui J, Nauche B, Côté R, Daskalopoulou SS. Circulating adiponectin and carotid intima-media thickness: A systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 2016;65(7):968-86. doi: 10.1016/j.metabol.2016.03.008.
444. Burrin DG, Stoll B. Key nutrients and growth factors for the neonatal gastrointestinal tract. *Clin Perinatol* 2002;29(1):65-96.
445. Jacobi SK, Odle J. Nutritional factors influencing intestinal health of the neonate. *Adv Nutr* 2012;3(5):687-96. doi: 10.3945/an.112.002683.
446. Martins L, Seoane-Collazo P, Contreras C, González-García I, Martínez-Sánchez N, González F, Zalvide J, Gallego R, Diéguez C, Nogueiras R, et al. A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance. *Cell Rep* 2016;16(8):2231-42. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.045.
447. Tong Q, Ye C, McCrimmon RJ, Dhillon H, Choi B, Kramer MD, Yu J, Yang Z, Christiansen LM, Lee CE, et al. Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell Metab* 2007;5(5):383-93. doi: 10.1016/j.cmet.2007.04.001.
448. Strandvik B. The omega-6/omega-3 ratio is of importance! *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;85(6):405-6. doi: S0952-3278(11)00122-0 [pii] 10.1016/j.plefa.2011.09.001.
449. Hauner H, Brunner S, Amann-Gassner U. The role of dietary fatty acids for early human adipose tissue growth. *Am J Clin Nutr* 2013;98(2):549S-55S. doi: 10.3945/ajcn.112.040733.