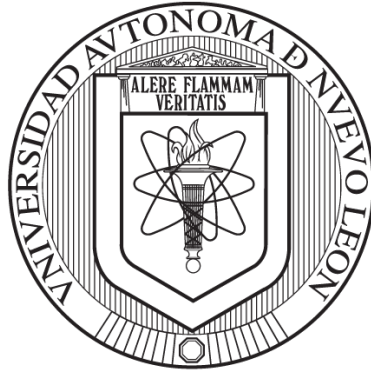


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



**POSIBLE RIESGO CARCINOGENICO EN LACTANTES POR
PRESENCIA DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE MATERNA
ASOCIADO AL CONSUMO DE ALIMENTOS DE SUS MADRES**

POR

LCN. ACOSTA ELIAS NALLELY

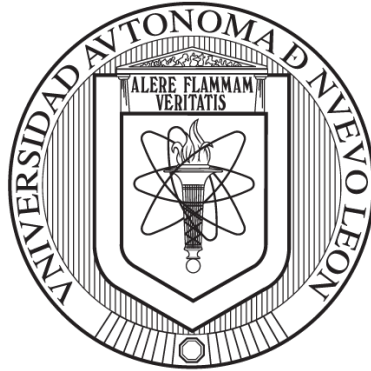
**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

MONTERREY, NUEVO LEÓN

JULIO, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



**POSIBLE RIESGO CARCINOGENICO EN LACTANTES POR
PRESENCIA DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE MATERNA
ASOCIADO AL CONSUMO DE ALIMENTOS DE SUS MADRES**

POR

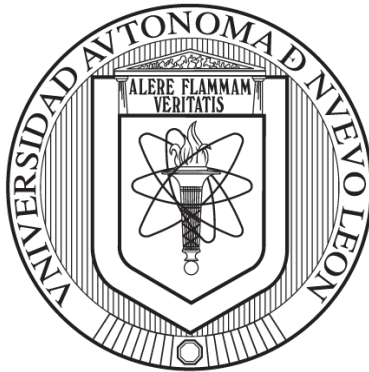
LCN. ACOSTA ELIAS NALLELY

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

MONTERREY, NUEVO LEÓN

JULIO, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



**POSIBLE RIESGO CARCINOGENICO EN LACTANTES POR
PRESENCIA DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE MATERNA
ASOCIADO AL CONSUMO DE ALIMENTOS DE SUS MADRES**

POR

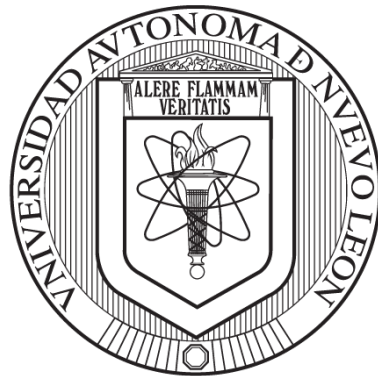
LCN. ACOSTA ELIAS NALLELY

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

MONTERREY, NUEVO LEÓN

JULIO, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN



**POSIBLE RIESGO CARCINOGENICO EN LACTANTES POR
PRESENCIA DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE MATERNA
ASOCIADO AL CONSUMO DE ALIMENTOS DE SUS MADRES**

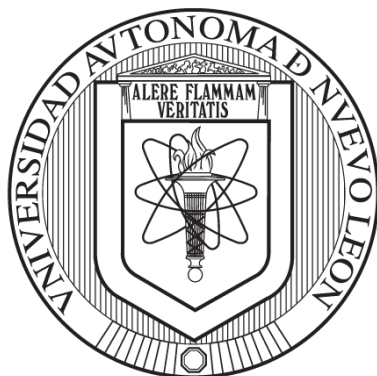
Presenta:

LCN. ACOSTA ELIAS NALLELY

MONTERREY, NUEVO LEÓN

JULIO, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN



**POSIBLE RIESGO CARCINOGENICO EN LACTANTES POR PRESENCIA
DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE MATERNA ASOCIADO AL CONSUMO
DE ALIMENTOS DE SUS MADRES**

PRESENTA:

LCN. NALLELY ACOSTA ELIAS

DIRECTOR

DR. ROGELIO SALAS GARCÍA

CODIRECTORA

DRA. AURORA DE JESÚS GARZA JUÁREZ

ASESORA

DRA. ALEXANDRA TIJERINA SAENZ

MONTERREY, NUEVO LEÓN

JULIO, 2022

APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA

POSIBLE RIESGO CARCINOGENICO EN LACTANTES POR PRESENCIA DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE MATERNA ASOCIADO AL CONSUMO DE ALIMENTOS DE SUS MADRES

Dr. Rogelio Salas García

Presidente

Dra. Alexandra Tijerina Saenz

Secretaria

Dra. Aurora de Jesús Garza Juárez

Vocal

Dra. Blanca Edelia Martínez González

Subdirectora de investigación, Innovación y Posgrado

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El comité de evaluación de tesis APROBÓ la tesis titulada “**POSIBLE RIESGO CARCINOGENÉTICO EN LACTANTES POR PRESENCIA DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE MATERNA ASOCIADO AL CONSUMO DE ALIMENTOS DE SUS MADRES**” presentada por la LCN. Nallely Acosta Elias, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Dra. Alexandra Tijerina Saenz
Presidenta

Dr. Rogelio Salas García
Secretario

Dra. Auorara de Jesús Garza Juárez
Vocal

DRA. EN C. BLANCA EDELIA MARTÍNEZ GONZÁLEZ
SUBDIRECTORA DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE SALUD PUBLICA Y NUTRICIÓN DE LA U.A.N.L

PRESENTE. -

Nos permitimos comunicarle que hemos concluido la dirección y Co-dirección de la tesis titulada **“POSIBLE RIESGO CARCINOGENICO EN LACTANTES POR PRESENCIA DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE MATERNA ASOCIADO AL CONSUMO DE ALIMENTOS DE SUS MADRES”** presentado por la LCN. Nallely Acosta Elias, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro particular, le envió un cordial saludo.

Atentamente

“Alere Flamman Veritatis”

Monterrey, Nuevo León a ___ de _____ de _____

Dr. Rogelio Salas García
Director de Tesis

Dra. Aurora De Jesús Garza Juárez
Codirectora de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FASPIN) y la Facultad de Medicina en especial al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular por brindarme las herramientas e instalaciones necesarias para culminar mis estudios y objetivos del presente proyecto. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante el tiempo de estudio. Al PAICYT por financiar el desarrollo del proyecto.

A mi director de tesis el Dr. Rogelio Salas García por el tiempo, confianza, compromiso, sugerencias e incondicional apoyo durante estos dos años para desarrollar el proyecto. Además de brindarme las herramientas necesarias para culminar mis estudios de forma satisfactoria.

A la Dra. Aurora de Jesús Garza Juárez por su apoyo, sabiduría y consejos para el desarrollo de los análisis de laboratorio necesarios para el estudio y brindarme un espacio dentro del laboratorio.

Un agradecimiento especial al Dr. Roberto Dávila y Olympia Aguilar por su disposición para el reclutamiento de las muestras de leche. Brindar su tiempo e incondicional apoyo y formar parte esencial para el desarrollo de este proyecto.

A todas las personas que conocí en el camino que me ayudaron y se hicieron amigos, por estar siempre presente y ser un apoyo durante esta etapa de mi vida.

Mi mayor agradecimiento es a mis padres por ser el pilar más importante en mi vida. Por cada consejo, por impulsarme, por darme oportunidades para crecer académica y profesionalmente. Sin ellos nada hubiera sido posible, son mi más grande ejemplo y soy muy afortunada de tenerlos.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme permanecer con su salud y guiarme por un buen camino estos dos años para concluir de forma satisfactoria mis estudios.

Este proyecto de tesis tiene una dedicación especial a las personas más importantes de mi vida: mis hermanas, sobrinas, pero en especial a mis padres: Graciela Elias y Leonardo Acosta.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Leche materna	3
1.2 Estructura de la leche materna	3
1.2.1 Lípidos	3
1.2.2 Proteína	4
1.2.3 Nitrógeno no proteico	4
1.2.4 Carbohidratos	4
1.2.5 Propiedades	4
1.3 Micotoxinas	5
1.3.1 <i>Aspergillus Flavus</i>	6
1.3.2 Aflatoxinas	6
1.3.3 Aflatoxina B ₁ y M ₁	7
1.3.4 Biosíntesis de aflatoxina B ₁	8
1.3.5 Metabolismo y digestión de aflatoxina B ₁	8
1.3.6 Interacción aflatoxinas – cuerpo humano	8
1.3.7 Método de Prueba para Aflatoxinas	9
1.3.7.1 HPLC	9
1.3.7.2 Inmunoensayos	10
1.4 Riesgos relacionados a la ingesta de aflatoxina	11
1.5 Repercusiones a la salud humana por el consumo de aflatoxina	12
1.6 Ocurrencia de aflatoxinas en alimentos	13
1.7 Incidencia de Aflatoxina en Leche Materna	14
1.8 Aflatoxina en Leche Materna y Alimentación	15
1.8.1 Métodos de Eliminación y Detoxificación de Aflatoxinas	16
1.9 Normativa nacional e internacional para aflatoxina M ₁	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	21

4.	OBJETIVOS	21
6.1	Objetivo General	21
6.2	Objetivos Específicos	21
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1	Diseño del estudio	22
6.2	Difusión del estudio	22
6.3	Método de muestreo	22
6.4	Criterios de selección	22
6.5	Recolección y manejo previo de la muestra	23
6.6	Desarrollo de la técnica	24
6.7	Protocolo de sanitización de materiales y área de trabajo post estudio	29
6.8	Cálculo de la exposición a la AFM ₁ en población infantil	30
6.9	Estimación del riesgo (IR) carcinogénico a AFM ₁	31
6.10	Variables de estudio	32
6.12	Plan de análisis estadístico	33
6.	CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD	37
7.	RECURSOS	38
	Instalaciones	38
	Materiales	38
	<i>Equipo</i>	38
	<i>Materiales</i>	38
8.	RESULTADOS	39
9.	DISCUSIÓN	44
10.	CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES	46
11.	REFERENCIAS	47
12.	ANEXOS	57
	ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	57
	ANEXO 2. RECORDATORIO DE 24 HORAS	58

ANEXO 3. CUESTIONARIO SEMI-CUANTITATIVO DE FRECUENCIA DE ALIMENTOS	60
ANEXO 4. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	62
ANEXO 5. RESUMEN CURRICULAR	64
ANEXO 6. ARTICULO CIENTÍFICO	65

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pagina
I. Descripción de participantes y agrupación de lactantes por grupo de edad	39
II. Estimación del consumo diario de leche humana y/o fórmulas lácteas en lactantes y peso corporal promedio (PCP) por grupos de edad de acuerdo con la ENSANUT 2018 en N.L.	45
II. Operalización de variables	49
III. Concentración de AFM ₁ por grupo de edad	52
IV. Ingesta Diaria Estimada (IDE) de aflatoxina M1 y el índice de riesgo carcinogénico (IRC) según al grupo de edad infantil	53
V. Estimación de ingesta dietética diaria de macronutrientes en gramos según cuestionario de frecuencia semicuatativa de alimentos	54
VI. Estimación del porcentaje de distribución de calorías totales por grupo de alimentos según cuestionario de frecuencia semicuatitativa de consumo de alimentos	54
VII. Alimentos con relación a la concentración de Aflatoxina M1 en leche materna.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Estructura química de la aflatoxina B ₁	7
2. Estructura química de la aflatoxina B ₁	7
3. Frascos para recolección de muestras con código de identificación (cada participante tendrá uno asignado)	24
4. Kit RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M ₁ de R-Biopharm AG (Alemania).	25
5. Diagrama de flujo para determinación de aflatoxinas en leche materna por método competitivo ELISA	

NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
A. <i>Flauvs</i>	<i>Aspergellius flavus</i>
A. <i>Parasiticus</i>	<i>Aspergellius Parasiticus</i>
AFB₁	Aflatoxina B1
AFM₁	Aflatoxina M1
AST	Aspartato aminotransferasa
CFCA	Cuestionario semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EE. UU	Estados Unidos de Norte América
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018
g	Gramos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDE	Ingesta Diaria Estimada
IDT	Ingesta Diaria Tolerable
IDP	Ingesta diaria probable
l	Litros
kg	Kilogramos
LOEL	Nivel mínimo o mínimo de efecto observado
ng	nanogramos
NOEL	Nivel sin efecto observado
OMS	Organización Mundial de la Salud
PPT	Partes por trillón
RIA	Radioinmunoensayos
R24	Recordatorio alimentario de 24 horas
TD50	Dosis toxica medida

RESUMEN

Posible riesgo carcinogénico en lactantes por presencia de aflatoxina M₁ en leche materna asociado al consumo de alimentos de sus madres

Introducción: La aflatoxina M₁ es considerada un metabolito tóxico, inmunosupresor y carcinogénico. Tiene de manera natural presencia en todo el mundo y su fácil desarrollo en alimentos se debe a condiciones ambientales favorables. La exposición infantil a AFM₁ se debe principalmente a la presencia de la toxina en leche materna y fórmulas lácteas. El objetivo del presente estudio fue analizar el posible riesgo carcinogénico en lactantes por presencia de aflatoxina M₁ en leche materna asociado al consumo de alimentos de sus madres. **Metodología:** Se recolectaron muestras de leche materna (n=123) de mujeres en periodo de lactancia que acudían a visitas periódicas en centros de salud del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Se realizó una determinación cuantitativa por método de ELISA, usando el kit RIDASCREEN Aflatoxina M1 y una estimación de la exposición de AFM₁ en infantes con la ecuación propuesta por Quevedo-Garza et al., (2020). Se estableció el índice de riesgo carcinogénico (IRC) propuesto por Kuiper–Goodman (1994) y Quevedo-Garza et al. (2020) de 2 ng/kg de peso/día. **Resultados:** Se encontró la presencia de AMF1 en el 100% de las muestras con una media de 17.04 ng/L en un rango de 5.00 a 66.23 ng/L. La estimación de la ingesta de AFM₁ por leche materna fue de 1.09 a 20.17 ng/kg/d, mayor a la recomendación de la ingesta diaria tolerable, indicando riesgo carcinogénico lactantes de 0 a 24 meses. La alimentación de las participantes se correlacionó significativamente (p<0.05) con niveles de AFM₁ determinados en las muestras, siendo té o infusiones, pierna de pollo, cerveza, jamón de pavo, bolillo, alita de pollo, cacahuates/habas/pepitas, leche en polvo Liconsa y pistaches los alimentos que podrían determinar la presencia de AFM₁ en leche materna. **Conclusión:** Se reporta una contaminación de AFM₁ en leche materna y se considera necesario establecer programas de salud pública para brindar educación nutricional a las mujeres antes y durante los periodos de lactancia.

ABSTRACT

Possible carcinogenic risk in infants due to the presence of aflatoxin m1 in breast milk associated with their mothers' food consumption

Introduction: Aflatoxin M1 is considered a toxic, immunosuppressive and carcinogenic metabolite. It has a natural presence throughout the world and its easy development in food is due to favorable environmental conditions. Childhood exposure to AFM₁ is mainly due to the presence of the toxin in breast milk and milk formulas. The aim of this study was to study the possible carcinogenic risk in infants due to the presence of aflatoxin M1 in breast milk associated with the consumption of their mothers' food. **Methodology:** Breast milk samples (n=123) were collected from lactating women who attended regular visits to health centers in the metropolitan area of Monterrey, Nuevo León. A quantitative determination was made by ELISA method, using the RIDASCREEN Aflatoxin M1 kit and an estimate of AFM₁ exposure in infants with the equation proposed by Quevedo-Garza et al., (2020). The carcinogenic risk index (CRI) proposed by Kuiper-Goodman (1994) and Quevedo-Garza et al. (2020) of 2 ng/kg of weight/day. **Results:** The presence of AMF₁ was found in 100% of the samples with a mean of 17.04 ng/L in a range of 5.00 to 66.23 ng/L. The estimated intake of AFM₁ through breast milk was 1.09 to 20.17 ng/kg/d, higher than the recommended tolerable daily intake, indicating a carcinogenic risk for infants aged 0 to 24 months. The diet of the participants correlated significantly (p<0.05) with levels of AFM₁ determined in the samples, being tea or infusions, chicken leg, beer, turkey ham, bolillo, chicken wing, peanuts/fava beans/nuggets, milk powdered Liconsa and pistachios the foods that could determine the presence of AFM₁ in breast milk. **Conclusion:** A contamination of AFM₁ in breast milk is reported and it is considered necessary to establish public health programs to provide nutritional education to women before and during lactation periods, so that lactating women reduce susceptibility to contamination by AFM₁ and minimize their passage into breast milk.

1. ANTECEDENTES

1.1 Leche materna

La leche materna es reconocida como el mejor alimento que puede recibir un neonato/infante para su óptimo crecimiento, se considera como un biofluido altamente complejo que facilita la transición y adaptación fuera del útero promoviendo un correcto desarrollo cerebral, inmunológico e intestinal (Ballard et al., 2013; Shah et al., 2020 y Lawrence et al., 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere brindar lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses de edad, continuando con lactancia y alimentación complementaria hasta los 2 años o más según la decisión de madre e hijo (OMS, 2011).

Es importante reconocer que la leche humana es un biofluido propio de cada mujer, distinguido por una extrema variabilidad en su composición nutricional y contenido de compuestos bioactivos. Desde una perspectiva evolutiva, su composición puede ir cambiando a lo largo del tiempo adaptándose a las necesidades propias del lactante como lo es mantener un estado nutricio o proteger contra agentes infecciosos. Existen factores que tendrán influencia en la composición de la leche materna como lo es la dieta, genética, enfermedades de la madre, tiempo de gestación, tiempo de lactancia y genotipo (Mosca et al., 2017).

1.2 Estructura de la leche materna

1.2.1 Lípidos

Principalmente se encuentran en forma de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos de cadena corta, ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados y fosfolípidos (Wagner et al., 2021). Constituyen del 40 - 55% de la composición de la leche materna representando la principal fuente de energía del infante (Ballard et al., 2013).

1.2.2 Proteína

La leche humana contiene cantidades apropiadas de proteína principalmente en forma de caseína, suero y mucinas, representando el tercer sólido más abundante (Wagner et al., 2021 y Mosca et al., 2017). La caseína se ensambla en micelas mientras que el suero está presente en solución. Las principales proteínas de suero son la alfa-lactoalbúmina, lactoferrina, lisozimas y IgA secretora, caseínas alfa, beta y k (Mosca, 2017). La proporción suero-caseína de la leche madura es de 60:40 (Boundry et al., 2021).

1.2.3 Nitrógeno no proteico

Comprende el 25% del contenido de nitrógeno presente en la leche materna. Dentro de este grupo se incluye la urea, creatinina, nucleótidos, aminoácidos libres y péptidos. En particular los nucleótidos deben ser considerados como nutrientes esenciales por su importante rol en el desarrollo de numerosas funciones celulares (Mosca et al., 2017).

1.2.4 Carbohidratos

El principal disacárido presente en la leche materna es la lactosa y es dentro de los macronutrientes el que tiene menor variabilidad. Sin embargo, se ha identificado que las madres con mayor producción de leche tienen una concentración más alta de lactosa (Wagner. et al., 2021 y Ballar et al., 2013).

1.2.5 Propiedades

En definitiva, la leche materna tiene una alta capacidad funcional para el crecimiento del lactante, lo que se atribuye a su alta complejidad nutritiva. Es esencial por su excelente virtud de promover un correcto desarrollo

intestinal y estimular la absorción de nutrientes. Asimismo, posee una actividad antimicrobial e inmunológica por tanto disminuye el riesgo de desarrollo de morbilidades e infecciones. Por otra parte, tiene un alto impacto en el desarrollo de funciones celulares, actuando con un modulador metabólico regulando actividades enzimáticas y promoviendo el desarrollo de la maduración del sistema gastrointestinal e inmunológico. De igual importancia tiene una alta capacidad para promover el desarrollo del sistema nervioso central y la función neurocognitiva (Mosca et al., 2017 y Picaud et al., 2017).

1.3 Micotoxinas

Los hongos micotoxigénicos pueden producir metabolitos secundarios conocidos como micotoxinas. La OMS define a una micotoxina como un compuesto químico tóxico producido por mohos (hongos) los cuales son considerados tóxicos cuando están presentes en la alimentación humana. Principalmente la presencia de micotoxinas se asocia a problemas en el cultivo y deterioro en la producción de alimentos, pero debido a sus características propias descritas pueden llegar al alcance del consumidor sin alterar el sabor, color u olor poniendo en riesgo la integridad de la salud. En la actualidad se han identificado cultivos susceptibles a la producción de micotoxinas, dentro de los principales se encuentran los alimentos pertenecientes al grupo de cereales, frutos secos, nueces, entre otros (Winter, 2019 y OMS, 2018).

Existen cientos de micotoxinas, algunas de ellas se utilizan en antibióticos como la penicilina y otras son consideradas extremadamente tóxicas, como las aflatoxinas pertenecientes al género *Aspergillus*. El riesgo de contaminación y severidad de la presencia de micotoxinas puede variar significativamente de una región a otra e incluso por año (Krska et al., 2012).

1.3.1 *Aspergillus Flavus*

Es un hongo filamentoso, considerado como la especie con mayor capacidad para producir aflatoxinas y se caracteriza por su reproducción asexual, ciclo celular y su variabilidad de especies. Su hábitat natural es el suelo y para su crecimiento requiere la interacción entre hongo, hospedero y ambiente. Las condiciones óptimas para su desarrollo son una humedad ambiental entre el 70 - 90%, porcentaje de agua en semilla o grano del 15-20% y temperatura desde 0°C hasta 45°C. A pesar de existir más de 20 variantes de aflatoxinas, la más relevante es la aflatoxina B₁ (AFB₁) por sus numerosos efectos perjudiciales en la salud humana que ha mostrado su ingesta (Muñoz et al., 2020 y Martínez-Padrón, *et al.* 2013).

1.3.2 Aflatoxinas

Las aflatoxinas son categorizadas como metabolitos altamente tóxicos, inmunosupresores y carcinogénicos, intensamente fluorescentes en luz ultravioleta, poseen alta solubilidad en compuestos orgánicos (etanol), insolubles en agua, incoloros e inodoros y son provenientes de las especies de hongo *Aspergillus*: *A. Flavus* y *A. Parasiticus*, generalmente presentes en vegetación muerta o en descomposición. *A. Flavus* produce aflatoxinas de tipo B, a diferencia *A. Parasiticus* genera aflatoxinas B y G (Kumar et al., 2017; Knutsen et al., 2018 y Frisvad et al., 2019).

La presencia de aflatoxinas de forma natural alrededor del mundo se debe a condiciones ambientales favorables como temperaturas elevadas y gran humedad, característica de zonas tropicales y subtropicales, de la misma manera contribuye la tensión generada por sequías, daños ocasionados por insectos y malas prácticas de almacenamiento. Facilitando el desarrollo en productos agrícolas (Ostry, 2017; Landeros, 2012; Carvajal, 2013; OMS, 2018 y IARC, 2012).

1.3.3 Aflatoxina B₁ y M₁

La aflatoxina M₁ (AFM₁) es el metabolito hidroxilado de la aflatoxina B₁ (AFB₁). AFB₁ es considerada como el compuesto con mayor toxicidad producido por estos hongos, el cual se metaboliza en el hígado por el citocromo P450 microsomal y su metabolito AFM₁. Ambas son excretadas por vía urinaria o en el caso de animales o humanos en periodo de lactancia un porcentaje será excretado por la leche. La IARC ha reportado a AFB₁ y AFM₁ como metabolitos carcinogénicos. De modo que su consumo en lactantes resulta alarmante por la importancia y dependencia en la ingesta de leche materna como también su lenta capacidad de biotransformación de compuestos cancerígenos (Landeros et al., 2012 y IARC, 2012).

Figura 1. Estructura química de la aflatoxina B₁

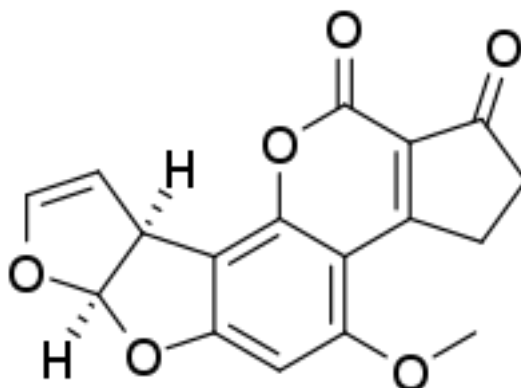
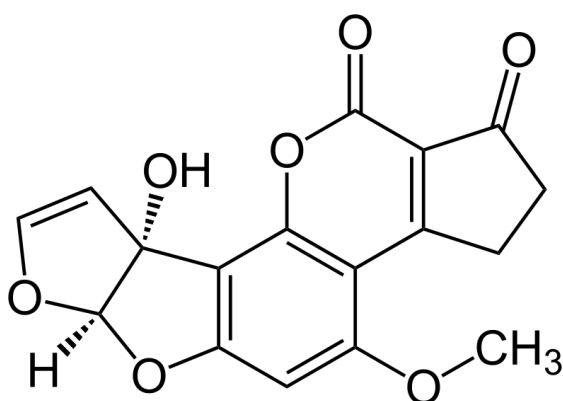


Figura 2. Estructura química de la aflatoxina M₁



1.3.4 Biosíntesis de aflatoxina B₁

Se obtiene a partir de la ruta metabólica de los policétidos. Son sintetizadas por hongos filamentosos y se ven involucradas 23 reacciones enzimáticas, 15 intermediarios y 5 reacciones químicas: condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación. Como resultado se obtiene una molécula formada por un anillo cumarín ligado a una molécula de bishidrofurano y a una ciclopentanona. Molecularmente se ven involucrados 25 genes responsables en los pasos de interconversión, los cuales han sido aislados y secuenciados (Zumbado et al., 2014 y Carvajal, 2013).

1.3.5 Metabolismo y digestión de aflatoxina B₁

La absorción de aflatoxina B₁ o M₁ tiene lugar en el intestino delgado, facilitada por su alta liposolubilidad y permeabilidad intestinal derivado del consumo de alimentos contaminados. Continuando con el transporte en el torrente sanguíneo al hígado por los glóbulos rojos y proteínas plasmáticas. Las células hepáticas metabolizan a las aflatoxinas en el retículo endoplasmático y en consecuencia de una hidroxilación se convierten en aflatoxinas P₁, M₁, Q₁, reacción que tiene lugar en el citocromo P450 y participan 6 enzimas: CYP1A2, 2B6, 3A4, 3A5, 3A7 y GSTM1 (Carvajal, 2013; Martinez et al., 2013 y Zumbado et al., 2014).

1.3.6 Interacción aflatoxinas – cuerpo humano

Actúan como inmunosupresoras de la fagocitosis y la síntesis proteica, en consecuencia, a la transformación de epóxidos reactivos en el hígado, que detienen la formación de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y proteínas en los ribosomas. Su potencial mutagénico tiene relación con su estructura química y similitud a la de los ácidos nucleicos y proteínas, lo que predispone su facilidad para unirse a ellos a través de enlaces

covalentes. El producto de la unión de estas dos moléculas tiene como resultado la molécula aflatoxina B₁-guanina y una peroxidación de lípidos, provocando interrupciones en la transcripción y traducción de ADN. El efecto que se produce a nivel celular es la inhibición del ADN, ARN, mitosis, alteraciones cromosómicas que a su vez resultan en efectos carcinogénicos, defectos congénitos o cambios en el ADN de una célula (Carvajal, 2013; Martínez et al., 2013 y Zumbado et al., 2014).

1.3.7 Método de Prueba para Aflatoxinas

Un correcto análisis laboratorial de alimentos es fundamental para el control y protección de la salud pública frente a los contaminantes tóxicos como lo son las aflatoxinas. Con relación a las micotoxinas, el proceso para su muestreo y análisis es complejo en consecuencia a la presencia de posibles interferencias y efectos de matriz que complican la determinación de estos analitos como lo son los bajos límites de detección requeridos y a que su distribución en el producto no se presenta de manera homogénea (Herrera et al., 2012).

El proceso de determinación de micotoxinas en alimentos sólidos y líquidos tiene diferentes fases con la finalidad de evitar las posibles interferencias. Un correcto muestro y evitar muestras heterogéneas como también utilizar técnicas de análisis laboratorial oportunas como lo es la cromatografía líquida de alta resolución (high-performance liquid chromatography (HPLC) o la técnica inmunoenzimática ofrece resultados más certeros sobre la presencia de aflatoxina en alimentos (Herrera et al., 2012).

1.3.7.1 HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es el procedimiento utilizado con mayor frecuencia para la determinación de aflatoxinas. Su

principio se sustenta en el equilibrio de la concentración de los compuestos de la muestra presentes en dos fases no miscibles: *fase estacionaria*, inmobilizada en una columna o fijada sobre un soporte y; *fase móvil*, se desplaza en el seno de la primera (Martínez et. al, 2013).

Consiste en la separación, identificación y cuantificación de los constituyentes de una mezcla. La velocidad de elución de los analitos de interés presentes en la fase móvil dependerá de la solubilidad de éstos en la fase móvil y de la fuerza de interacción de dicho compuesto con la fase estacionaria (Martínez et. al, 2013).

La técnica HPLC requiere conocer las características químicas, físicas y conformación molecular para una adecuada separación y determinación de las aflatoxinas dependiendo de su polaridad. En estas técnicas tanto la fase móvil como la fase estacionaria juegan un papel importante en la separación, lo que hace que la retención cromatográfica sea el resultado del trinomio fase móvil/fase estacionaria/analito (Herrera et al., 2012).

1.3.7.2 Inmunoensayos

Existen diversos inmunoensayos entre los que sobresale: método de *ELISA (ensayos inmunológicos de enzimas ligadas)* que es un procedimiento de cribado basado en la reacción específica antígeno-anticuerpo y puede ser cualitativo o cuantitativo; *RIA (radioinmunoensayos)*, se fundamenta en añadir un anticuerpo y una micotoxina marcada radiactivamente (en una cantidad conocida por el laboratorista) al medio de reacción, finalmente se realiza una lavado y medición de la radioactividad emitida por la muestra, el resultado es equivalente a la cantidad de micotoxina presente en la muestra problema y; las columnas de inmunoafinidad. La mayoría de estos métodos son muy sensibles, específicos y fáciles de operar (Medina et al., 1994 y Herrera et al., 2012).

1.4 Riesgos relacionados a la ingesta de aflatoxina

Al realizar una evaluación de riesgo para las micotoxinas, se estima la probabilidad de daño que podría ocurrir en los seres humanos como resultado del consumo de alimentos o productos alimenticios que contienen micotoxinas. Dichas evaluaciones de riesgos tienen dos componentes principales: la evaluación de la exposición, que puede ser diferente para diferentes países o incluso grupos de personas dentro de los países, y la evaluación de peligros. Como se usa aquí, "peligro" es una propiedad intrínseca de una sustancia química y se refiere a la presencia de efectos tóxicos en especies específicas con un grado particular de exposición. "Riesgo" implica cierta incertidumbre, y en términos absolutos es la frecuencia prevista de aparición de efectos adversos de una exposición determinada, o en términos relativos, como se usa aquí, es la expresión de exposición (ingesta diaria probable (IDP)) relativa a la dosis que se considera segura. "Seguridad" o "dosis segura" es la probabilidad de que no se produzcan lesiones en condiciones específicas de exposición (Kuiper-Goodman 1994).

Los aspectos cuantitativos se refieren al resultado numérico de un estudio, como las tasas de respuesta, los períodos de latencia, los niveles de dosificación, etc. Normalmente, las tasas de respuesta se expresan en términos de una curva de dosis-respuesta, con respuestas que van desde los efectos observados en solo pocos animales a los efectos en muchos animales (Kuiper-Goodman, T., 1994).

En el caso de los carcinógenos, la curva dosis-respuesta puede definirse de la siguiente manera: (i) la dosis experimental más alta a la que no se observaron efectos, es decir, el nivel sin efecto observado (NOEL); (ii) el nivel mínimo o mínimo de efecto observado (LOEL), cuando esté disponible; y (iii) el TD₅₀, que se ha utilizado como indicador de potencia cancerígena. El TD₅₀ se ha definido como la tasa de dosis a la que se esperaría que el 50% de los animales desarrollen un tumor particular o una combinación de tumores,

si se administra durante una vida útil estándar "(24 meses en el roedor). La relación relativa del NOEL y el TD₅₀ da una indicación de la pendiente de la curva dosis-respuesta. Antes de que se puedan interpretar los valores numéricos, es necesario determinar su importancia biológica utilizando un enfoque de ponderación de la evidencia. También deberá determinarse que el nivel de dosis más alto fue lo suficientemente alto pero no excedió (sustancialmente) la dosis máxima tolerada (MTB) (Kuiper-Goodman, T., 1994).

1.5 Repercusiones a la salud humana por el consumo de aflatoxina

La principal implicación sería la aflatoxicosis la cual es una patología causada por la ingesta de sustancias o comidas contaminadas con aflatoxinas, la cual puede presentarse con un cuadro agudo o crónico. Los efectos adversos y severidad están relacionados con la cantidad ingerida y tiempo de exposición (Ostry et al., 2017).

Aflatoxicosis aguda: es ocasionada por una ingesta de elevadas concentraciones de aflatoxinas, ocasionando daño principalmente en el hígado puesto que allí se metabolizan las aflatoxinas. En el transcurso de la enfermedad se describe una infiltración de grasa y muerte del tejido ocasionando una pérdida de funciones indispensables del hígado. Dentro de la sintomatología se encuentra una posible hepatitis aguda, vómito, diarrea, fiebre, hemorragias, necrosis y muerte. Dentro del transcurso de la enfermedad se induce una elevación de niveles de AST (Aspartato aminotransferasa) en sangre, siendo este un indicativo de deterioro hepático (Wild et al., 2009 y Gross-Steinmeyer et al., 2012).

Aflatoxicosis crónica: ocurre por la exposición de bajas concentraciones en un periodo de tiempo prolongado, el impacto a largo plazo es hepatitis crónica, cáncer, mutaciones, inmunosupresión, cirrosis, aplasia del timo, encefalitis, falla renal y neurotóxica. En bovinos se ha relación con alteraciones en los ciclos hormonales, implicando el riesgo de infertilidad, abortos y reducción en

la producción de leche (Islam et al., 2021, Zain et al., 2011; Wild et al., 2009 y Apeageyi et al., 1982).

Por otra parte, es importante recordar que la infancia y niñez son etapas de madurez y desarrollo, en consecuencia, la detoxificación por parte del hígado es más lenta en comparación a la etapa adulta, esto da lugar a una exposición más prolongada a esta toxina (Eaton et al., 1994). De tal forma la exposición a aflatoxinas contribuye al desarrollo de síndrome de Reye y Kwashiorkor especialmente en niños de los trópicos, malnutrición y retraso en el crecimiento. (Gong et al., 2003 y Martínez et. al, 2013).

1.6 Ocurrencia de aflatoxinas en alimentos

En la actualidad se ha identificado una amplia variedad de alimentos con presencia de aflatoxinas. Debido a la gran diversidad de efectos perjudiciales a la salud humana que han sido atribuidos a la ingesta de aflatoxinas resulta un tema de gran interés alrededor del mundo y en México.

Existen diferentes etapas en las cuales puede presentarse la contaminación de alimentos con aflatoxinas en la cadena de suministro de alimentos. Es importante recordar que debido a la gran capacidad termoresistente de las aflatoxinas aquellos alimentos que sean sometidos a altas temperaturas para su elaboración (ej. pasteurización y cocción) no quedan exentos a su presencia (Radonic et al., 2016, Carvajal, 2013 y OMS, 2018)

Se ha identificado la presencia de aflatoxinas en alimentos que presentan condiciones óptimas para su desarrollo, como lo son el maíz, arroz, trigo, sorgo, cacahuates, pistaches, nueces, pulpa seca de coco, girasol, soja, aceites vegetales sin refinar, almendras, avellanas, chile, pimienta, frutas desecadas, café y cacao, cereales y sus productos derivados (Martínez et. al, 2013).

En consecuencia, a la exposición del ganado a alimentos contaminados con aflatoxinas como granos y cereales, los productos cárnicos y derivados, como: res, cerdo, pollo, leche, huevo y derivados, asimismo son susceptibles a la contaminación por aflatoxinas, en consecuencia, al almacenamiento en tejidos de aflatoxina B₁ y su excreción en hembras por la leche como aflatoxina M₁ (Fu et. al., 2008).

1.7 Incidencia de Aflatoxina en Leche Materna

En la actualidad se ha evidenciado la presencia de aflatoxina M₁ en leche materna en más de 24 países. El país con la menor ocurrencia de muestras de leche materna contaminadas con AFM₁ es Brasil (2%) mientras que Gambia, Tanzania y Jordán reportan la presencia de AFM₁ en el 100% de las muestras analizadas. En relación con la concentración de aflatoxina en leche materna, Sierra Leona reporta la mínima (0.80 ng/L) y Emiratos Árabes Unidos la máxima (465.76 ng/L) (Fakhri et al., 2019).

Según los resultados, condiciones como la lluvia y bajo nivel socioeconómico incrementan significativamente la presencia de AFM₁. No obstante en los últimos años se ha presentado una disminución en la concentración de aflatoxinas en leche materna y se atribuye a una mejora en la higiene y educación a nivel mundial (Fakhri et al., 2019).

En el centro de México (n=112) se reportó una incidencia de AFM₁ en el 89% de las muestras examinadas con un rango de 2.01 a 34.24 ng/L y un promedio de ingesta diaria estimado de 2.35 ng/kg peso/d (Cantú-Cornelio, 2016). Por otra parte, en el norte de México (n= 21) se detectó la presencia de AFM₁ en el 100% de las muestras con una concentración media de 30.9 ng/L y un consumo de 2.6-6.8 ng/kg peso/d. De acuerdo con los límites establecidos por la Comisión Europea (25 ng/L) en el centro y norte de México el 7% y 38% respectivamente de las muestras excede esta cifra y en ambos

estudios la ingesta media es superior a índice de riesgo carcinogénico de 2 ng/kg peso/d (Guzmán-Pérez, 2019, Comisión Europea, 2016 y Kuiper-Goodman, 1994).

1.8 Aflatoxina en Leche Materna y Alimentación

La aflatoxina M₁ se ha identificado como el principal metabolito secundario de excreción en muestras de leche materna y animal por el consumo de alimentos contaminados con aflatoxina B₁ durante la lactancia (Azarikia et al., 2018, Sadeghi et al., 2009 y Siddika et al., 2020). El tiempo de concentración máxima en leche materna de AFM₁ oscila de 12 a 24 horas posteriores a la ingestión de alimentos contaminados, transcurridas 72 horas después del contacto con alimentos contaminados la concentración de aflatoxina en leche materna puede bajar hasta tener valores indetectables en la muestra (Radonic et al., 2016).

Los patrones dietéticos de la madre durante el periodo de lactancia se encuentran directamente relacionados con la concentración de aflatoxina M₁, lo que justifica la gran variabilidad que puede encontrarse de una madre a otra. Es preciso señalar que el grado de educación y nivel socioeconómico tiene una alta influencia en sus decisiones y patrones alimentarios (Bogalho et al., 2018 y Cantú-Cornelio et al., 2016).

Dentro de los alimentos que se han relacionado considerablemente con la presencia de AFM₁ en leche materna se incluyen: productos basados en cereales (pan y pasta), maíz, huevo, aceite de girasol, bebidas de cola, nueces, yogurt, leche y quesos (Sadeghi et al., 2009, Fakhri et al., 2019, Elaridi et al., 2017 y Cantú-Cornelio et al., 2016).

Por otra parte, no únicamente la susceptibilidad de alimentos será un detonante para el desarrollo de aflatoxinas, sino también las condiciones climáticas son factores determinantes para su crecimiento y desarrollo en alimentos, la estación del año que ha mostrado tener mayor influencia sobre

la concentración de aflatoxina presente en muestras de leche materna es el invierno, lo que propone una ingesta de alimentos con presencia de aflatoxinas B₁ y M₁ mayor que durante otra estación del año (Cantú-Cornelio et al., 2016).

Finalmente, la exposición a aflatoxinas a través de la leche materna varía de acuerdo con el periodo de lactancia. Se ha descrito en estudios una concentración de aflatoxinas mayor en el periodo de calostro relacionado a la alta afinidad de AFM₁ a proteínas en comparación a la leche de transición y madura. Por otra parte, es importante recordar que a partir de los 6 meses de vida comienza la alimentación complementaria, el peso del lactante va en incremento y disminuye el consumo de leche materna en consecuencia los valores de ingesta diaria probable de AFM₁ disminuyen (Guzmán-Pérez, 2019 y Cantú-Cornelio et al., 2016).

1.8.1 Métodos de Eliminación y Detoxificación de Aflatoxinas

La eliminación hace referencia a los procedimientos utilizados para eliminar o neutralizar las aflatoxinas de los alimentos, a diferencia la detoxificación hace referencia a los métodos para aminorar las cualidades tóxicas de las micotoxinas. El procedimiento de eliminación o detoxificación idóneo tiene la obligación de ser sencillo de efectuar, barato, no formar compuestos más tóxicos que la micotoxina original y no alterar las propiedades nutricionales y sensoriales de los alimentos. Existen diferentes métodos de descontaminación: *físicos, químicos y biológicos* (Martínez, et. al, 2013).

De manera general los procedimientos físicos comprenden la descontaminación de aflatoxinas por extracción con solventes y degradación como resultado de la exposición a altas temperaturas y radiación gamma o ultravioleta, utilizado en alimento para animales debido a la utilización de etanol como solvente, como limitante encontramos la capacidad termo

resistente que poseen las aflatoxinas. Los tratamientos químicos involucran la degeneración elemental por compuestos como aldehídos, agentes oxidantes, ácidos, bases y varios gases, promoviendo la inhibición de absorción en el sistema digestivo al momento de su consumo. Los procedimientos biológicos se basan en la utilización de bacterias, levaduras o sus enzimas correspondientes o aparatos metabólicos para deteriorar las aflatoxinas, aunque varias especies de bacterias y levaduras también pueden absorber las aflatoxinas (Ismail et al., 2018).

1.9 Normativa nacional e internacional para aflatoxina M₁

En los Estados Unidos Mexicanos se establece por medio de la NOM-243-SSA1-2010 un límite máximo admisible de AFM₁ de 0.5 µg/kg en leche, fórmulas infantiles y productos derivados de leche y combinados. Países como Estados Unidos y Brasil establecen la misma regulación, sin embargo, no se especifica en la regulación de EE. UU. y la norma mexicana los niveles aceptables de AFM₁ en leche materna (NOM-243-SSA1,2010 y Quevedo, 2014).

A pesar de no existir ningún nivel inocuo para el consumo de aflatoxinas en el ser humano, la Food And Drug Administration de los Estados Unidos y la Comisión Europea ha establecido como límite 20 µg/kg de aflatoxinas totales en productos alimenticios agrícolas primarios y sus derivados (Comisión Europea, 2016). Los límites establecidos por la FDA están próximos del límite de detección de la metodología analítica (Bogantes-Ledezma et al., 2004). El Codex Alimentarius establece un valor de 0.05 µg/L máximo para el caso de sucedáneos de leche materna. A pesar de no existir una regulación, ésta debería ser inocua y libre de aflatoxinas (FAO, 1995).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las aflatoxinas son el producto de degradación secundario generados por hongos pertenecientes a varias especies de *Aspergillus*, especialmente *A. flavus* y *A. parasiticus*. Un aspecto muy particular de las micotoxinas mencionadas es que no generan alternaciones organolépticas en los alimentos contaminados, como podrían ser alternaciones en color, crecimiento de moho o cambios en sabor y textura. Estas toxinas se pueden encontrar en gran variedad de productos agrícolas, principalmente frutos secos, cereales, café, productos lácteos y especies (Martínez-Miranda et al., 2013).

La dimensión del problema radica en la estimación hecha por la FAO (2003), la cual indica que a nivel mundial existe una contaminación del 25% de los alimentos con aflatoxina, sin embargo, no existe un control preventivo y su desarrollo se facilita ante climas tropicales o subtropicales característico del estado de Nuevo León y la república mexicana. Asimismo, las condiciones de almacenamiento y transporte de alimentos pueden ser precursores para el crecimiento de la toxina.

Por consiguiente, la única manera de identificar la presencia de micotoxinas es mediante pruebas de laboratorio de alimentos por sus características incoloras e inodoras. Por lo que el consumidor no es capaz de identificar su presencia y prevenir su consumo (Krska et al., 2012).

Teniendo en cuenta las recomendaciones brindadas por la Organización Mundial de la Salud sobre brindar lactancia materna exclusiva y postergar hasta los 2 años con alimentación complementaria, se ha determinado la incidencia de aflatoxina M1 en muestras de leche materna (OMS, 2011 y Cantú-Cornelio, et al., 2016) en Nuevo León, México y alrededor del mundo. En el 2016 en el centro de México se realizó un estudio que encabezó Cantú-Cornelio, que tenía como objetivo evaluar la presencia de

aflatoxinas y su impacto en el desarrollo y crecimiento de lactantes, obteniendo como resultado, una presencia en el 89% de las muestras, de las cuales el 7% excedían la regulación de la Comisión Europea que establece un límite máximo permisible de 25 ng/L. Se reporta en 2019 por Gúzman-Pérez un comportamiento similar en el estado de Nuevo León, en donde se reportó una ocurrencia de aflatoxina en el 100% de las muestras de leche materna evaluadas (n=21), las cuales presentaron valores superiores a 2 ng/kg/d indicando potencial riesgo carcinogénico en los lactantes.

Es importante recordar la vulnerabilidad de lactantes en consecuencia a una incompleta etapa de madurez que se presenta de manera normal en las primeras etapas de la vida. En consecuencia, la proporción o dosis de ingesta se ve limitada por su ya mencionada inmadurez, es oportuno que los padres de familia estén alertas a la presencia de efectos secundarios por intoxicación de aflatoxinas, en los que se destaca: una inhibición en la síntesis de proteínas, síndrome de Reye, desnutrición aguda y crónica, inmunosupresión, disrupciones endocrinas, así como otros trastornos metabólicos. (Martínez et. al, 2013).

De tal manera resulta necesario definir la exposición de aflatoxina M₁ a través de la lactancia materna y su relación con la dieta de las madres. Es crucial definir y establecer el riesgo que se asocia a su consumo para la población infantil de Monterrey, Nuevo León, México. Con la finalidad de profundizar en los conocimientos del tema que permitan proteger la seguridad alimentaria de las madres en beneficio de un oportuno crecimiento y desarrollo de la población infantil.

2. JUSTIFICACIÓN

La Agencia Internacional de Investigaciones para el Cáncer (IARC) ha descrito a la aflatoxina M₁ como un potencial carcinógeno en humanos (International Agency for Research on Cancer, 2012). En particular a los infantes en periodo de lactancia la exposición crónica de aflatoxinas se relaciona con problemas de malnutrición aguda y crónica, cáncer de hígado y crecimiento inadecuado a lo largo de la infancia y en momentos subsiguientes de su vida.

El gran interés sobre el análisis del riesgo de aflatoxina M₁ radica justamente en las consecuencias en la salud de infantes a corto o mediano plazo. Asimismo, resulta de suma importancia conocer el grado de exposición y su relación con la dieta de madres en periodo de lactancia de Monterrey, Nuevo León, México. Con la finalidad de expandir los resultados obtenidos por Gúzman-Pérez (2019) y Quevedo-Garza (2014) en donde se ha identificado una exposición a aflatoxinas en lactantes en leche materna y fórmulas lácteas, respectivamente.

El presente estudio busca profundizar y dimensionar el grado de exposición en lactantes a esta micotoxina inmensamente perjudicial, con la finalidad de contribuir a la proyección de acciones correctivas orientadas a disminuir el riesgo de exposición. De este modo, resulta de importante precisar la ocurrencia de AFM₁ en leche humana de mujeres residentes de la ciudad de Monterrey, Nuevo León, para determinar la incidencia, evaluar el potencial de riesgo asociado a su consumo crónico e índice de riesgo carcinogénico en lactantes como su correlación con la dieta de madres en periodo de lactancia.

En definitiva, crear restricciones en el consumo de leche materna no es una alternativa para corregir la problemática a la cual nos enfrentamos, por el contrario, es oportuno crear estrategias en la alimentación materna y en la industria alimentaria que permita regular la concentración de aflatoxinas a la cual se exponen las madres lactantes a través de la alimentación.

3. HIPÓTESIS

Existe un posible riesgo carcinogénico en lactantes por presencia de aflatoxina M₁ en leche materna asociado al consumo de alimentos susceptibles de contaminación por aflatoxina M₁ en madres.

4. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Analizar el posible riesgo carcinogénico en lactantes por presencia de aflatoxina M₁ en leche materna asociado al consumo de alimentos de sus madres.

6.2 Objetivos Específicos

1. Estimar el índice riesgo de carcinogénico en lactantes en base a la medición y proyección de consumo de leche materna descrita por la ENSANUT 2018 y la ecuación por Kuiper-Goodman 1994.
2. Evaluar el consumo de alimentos susceptibles de contaminación con aflatoxina M₁ en las madres mediante cuestionario semi-cuantitativa de frecuencia de alimentos.
3. Asociar la presencia de aflatoxina M₁ en leche materna con el consumo de alimentos susceptibles de contaminación con aflatoxina M₁ de la madre.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio

Estudio descriptivo transversal en donde se analizó la presencia de AFM₁ en muestras de leche materna en la ciudad de Monterrey, Nuevo León y su relación con los alimentos ingeridos por la madre.

6.2 Difusión del estudio

La divulgación del estudio se realizó mediante la invitación telefónica o presencial a madres lactantes que acudían periódicamente a centros de salud en la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León por parte de personal de salud.

6.3 Método de muestreo

Se recolectaron 123 muestras de leche materna de mujeres mexicanas lactantes en visitas médicas periódicas a centros de salud locales (n= 26) de la zona metropolitana de la ciudad de Monterrey, Nuevo León (región nororiente de México), durante el periodo junio-septiembre 2021. La edad media de las participantes fue de 25 ± 6 años y la edad de los lactantes oscilo de los 0 - 36 meses de vida los cuales se agruparon en cuatro grupos, tal como se describe en la **Tabla 1**.

6.4 Criterios de selección

A. Criterios de inclusión

- Mujeres con un correcto estado de salud (sin patología diagnosticada)

B. Criterios de exclusión

- Mujeres lactando con diagnostico patológico previo o actual.

C. **Criterios de eliminación**

- Mujeres que no completaron con algún apartado del proceso de recolección de muestra
- Muestras con contaminantes físicos.

6.5 Recolección y manejo previo de la muestra

Se recolectaron las muestras de leche materna (15 ml) en condiciones higiénicas en recipientes de vidrio asépticos, protegidos de la luz y transportados a 4 °C en hieleras herméticas y posteriormente se refrigeraron hasta su uso a -18 °C. Antes del análisis, las muestras de leche materna se descongelaron durante la noche a 4 °C y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. La capa grasa se descartó y se usaron 100 µL de cada muestra de leche desgrasada en el ensayo ELISA. Todos los procedimientos seguidos en este estudio se ejecutaron de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, que dictamina la categorización de los remanentes biológico-infecciosos peligrosos y las especificaciones de su manejo (Secretaría de medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002).

Tabla 1. Descripción de participantes y agrupación de lactantes por grupo de edad (n=123)

	N	Media	Min – Max
Edad madre (años)	123	25 ± 6	16 – 42
Edad lactante (meses)	123	6 ± 6.9	0 – 36
Agrupación de lactantes por meses			
Edad	N	%	
0 a 6 meses	86	70	
7 a 12 meses	18	14.6	
13 a 24 meses	16	13	
25 a 36 meses	3	2.4	

Para el control en el análisis de la muestra y los datos recolectados en el R24 y CFCA se asignó a cada participante un código intransferible tal como se muestra en la en la **Figura 1**.



Figura 3. Frascos para recolección de muestras con código de identificación (cada participante tendrá uno asignado)

6.6 Desarrollo de la técnica

a) Detección cuantitativa de aflatoxina M1 en leche humana por método de inmunoensayo competitivo (ELISA)

El estudio de las muestras de leche materna reclutadas se llevará a cabo por medio del ensayo ELISA competitivo aplicando el equipo de prueba RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁ de R-Biopharm AG (Alemania). El cual es un inmunoensayo enzimático competitivo que se fundamenta en la reacción antígeno-anticuerpo por medio de la evaluación cuantitativa de aflatoxina M1 en leche.



Figura 2. Equipo de Prueba RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁ de R-Biopharm AG.
 Recuperado de: <https://food.r-biopharm.com/de/produkte/ridascreen-aflatoxin-m1>

Contenido del equipo de prueba RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁ de R-Biopharm AG

- Placa con 96 pocillos
- Disoluciones de aflatoxina M₁ (1,3 ml c/u) de: 0 ppt (estándar cero), 125 ppt, 250 ppt, 500 ppt, 1000 ppt, 2000 ppt
- Conjugado AFM₁-peroxidasa (3 ml) - tapa roja
- Anticuerpo anti-aflatoxina M1 (3 ml) - tapón negro
- Red Chromogen Pro (10 ml) - tapón marrón
- Solución stop (14 ml) - tapón amarillo
- Tampón de lavado (sal de tamponado)

Determinación de AFM₁ planteado por el fabricante ₁ (figura 3)

a) Proceso para la obtención de la muestra

- Las muestras obtenidas fueron almacenadas en un congelador, protegidas de la luz. Para su utilización se descongelaron a 4°C a lo largo de 12 horas.

- Una vez que las muestras estaban completamente líquidas se tomaron 15 mililitros y se colocaron en tubos desechables con tapadera que fueron previamente esterilizados y rotulados con el folio asignado para cada participante.
- Seguidamente con la ayuda de una palita se retiró la capa de grasa situada en la parte superior de la muestra para posteriormente continuar con una doble centrifugación por 10 min/3500 g/10°C para asegurar la remoción completa de la capa lipídica con el objetivo de evitar interferencias durante el reconocimiento del anticuerpo.
- Finalmente los microtubos con las muestras listas para su análisis se almacenaron en refrigeración y protegidas de la luz para continuar el resto de las preparaciones preliminares.

b) Consideraciones previas a la cuantificación de AFM₁

- Se aseguro de manera estricta una temperatura ambiente en el lugar de trabajo para posteriormente atemperar todos los reactivos y muestras.
- Igualmente se preparó con un día de anticipación el tampón de lavado (tampón PBS-Tween). Para ello se utilizó un sobre con la sal de tampón incluido en el kit y se disolvió en un litro de agua destilada, conservándolo en refrigeración (2-8°C) hasta el momento de su uso.

c) Procedimiento del test

Se realizó un lavado exhaustivo uniforme, sin dejar que los pocillos se sequen completamente y protegidos de la luz durante los periodos de incubación.

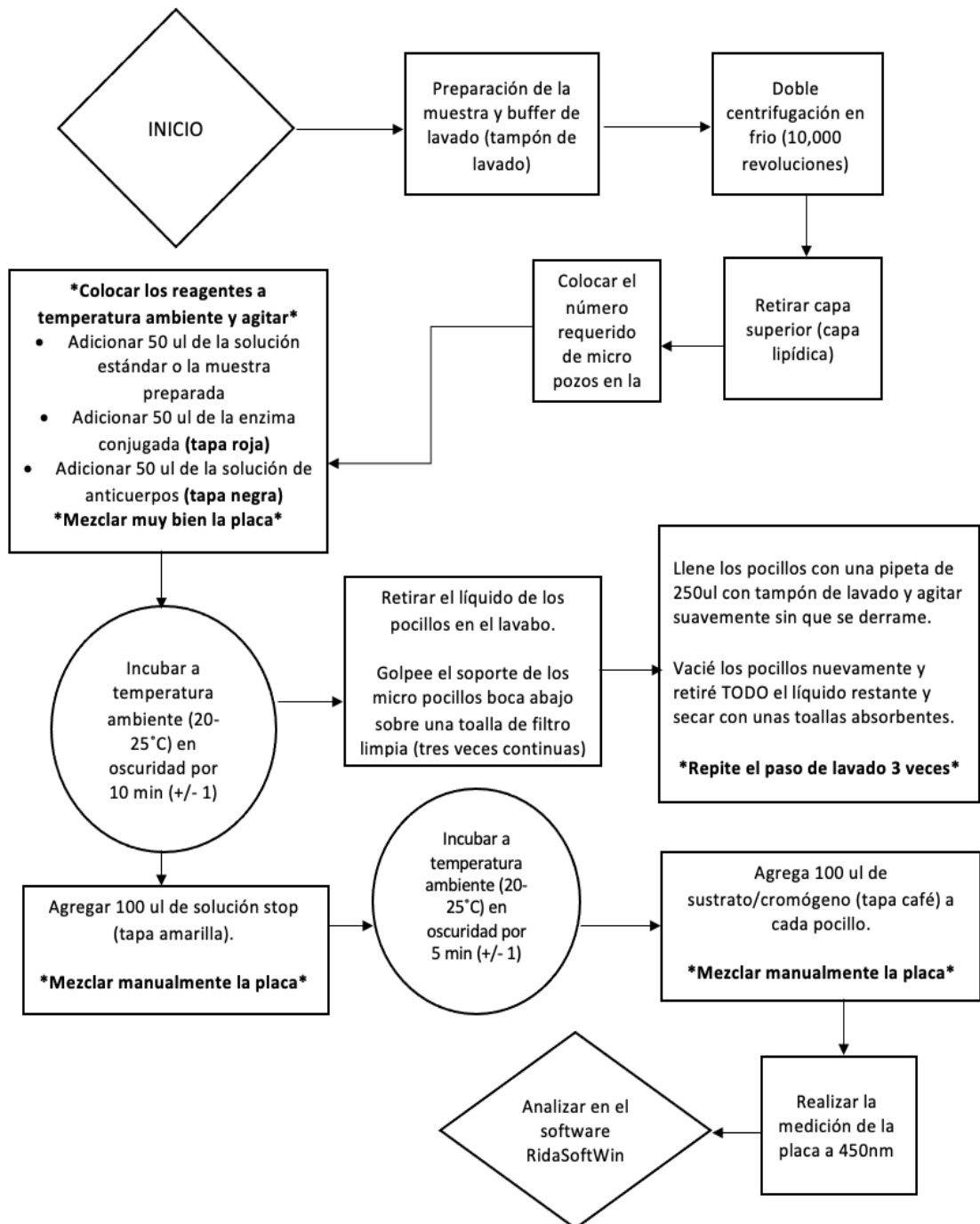
1. Se registro estrictamente cada una de las posiciones de los estándares y muestras.
2. Posteriormente se adiciono 50 µL de los estándares y muestras a los pocillos. Utilizando una punta de pipeta nueva para cada estándar y muestra.

3. Seguido se añadió 50 µL del conjugado de AFM₁-enzima (tapón rojo) a los pocillos correspondientes.
4. Adición de 50 µL de anticuerpo anti-aflatoxina M₁ (tapon negro) a cada pocillo. Mezclar suavemente el contenido de la microplaca e incubar 10 min (+/-1) a temperatura ambiente (20 – 25°C).
5. Vaciar los pocillos y golpear enérgicamente tres veces consecutivas el marco portapocillos sobre un papel absorbente limpio. Lavarlos con 250 µl con buffer de lavado, repetir este paso dos veces.
6. Añadir 100 µL de Red Chromogen Pro (tapón marrón) a cada pocillo. Mezclar suavemente el contenido de la microplaca e incubar 5 minutos (+/- 0,5) en oscuridad a 20 – 25°C
7. Adición de 100 µL de la solución stop (tapón amarillo) a cada pocillo. Mezclar suavemente el contenido de la microplaca y medir la absorción a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 minutos.

Especificidad del Kit Ridascreen® Aflatoxin M₁

Se declara por el fabricante una especificidad a aflatoxina M₁ del 100%, la cual será verificada analizando las reactividades cruzadas con las sustancias correspondientes en el sistema buffer. En las muestras, la especificidad puede desviarse de las determinadas en el sistema tampón debido a los efectos de la matriz. Debido a esto antes del análisis de sustancias con reactividad cruzada, se va a realizar el análisis de una muestra blanco para ajustar las mediciones y determinar el límite de detección de la sustancia en la matriz de muestra respectiva (R-Biopharm, 2018).

Figura 5. DIAGRAMA DE FLUJO PARA DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN LECHE MATERNA POR MÉTODO COMPETITIVO ELISA



6.7 Protocolo de sanitización de materiales y área de trabajo post estudio

Por motivo a la naturaleza y alto potencial tóxico a bajas de concentraciones de las aflatoxinas, se siguió el protocolo establecido por la NOM-243-SSA1-2010 del lugar de trabajo, material y equipo utilizados. El personal fue capacitado previamente y utilizo equipo de protección en todo momento (bata, guantes impermeables y lentes protectores).

Descontaminación del área de trabajo

Todas las muestras fueron manejadas como si estuvieran contaminadas con aflatoxinas durante su manejo por consiguiente todas las superficies incluyendo mesas de trabajo y paredes fueron aseadas con una toalla desechable con solución de hipoclorito de sodio.

Sanitización del equipo de laboratorio

El material de vidrio del laboratorio y los frascos que se utilizaron para la recolección de la muestra fueron sumergidos en una solución de hipoclorito (concentración entre 5-6%). Posteriormente, el material se enjuago con con abundante agua directo del grifo, seguido de un enjuague con agua destilada. El material fue secado por escurrimiento en superficies previamente descontaminadas.

Descontaminación de material desechable

Como medida de seguridad el material desechable se sumergió por 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio empleando cloro comercial y agua en la proporción 1:10. La solución descontaminante se descartó por el drenaje y los materiales desechables se colocaron en una bolsa de plástico sellada y rotulada para tirarse en el recipiente de desechos del laboratorio.

Procedimiento para derrames

La medida de correccion utilizada para los derrames ocurridos durante el procedimiento se trataron de manera inmediata con hipoclorito de sodio,

vertiéndose directamente del envase. Los líquidos sobrantes se limpiaron utilizando papel absorbente y se colocaron en una bolsa de plástico sellada.

Tratamiento de remanentes de extracto de muestras

El remanente de la muestra se trató con hipoclorito de sodio equivalente utilizando proporciones adecuadas para los residuos a tratar. Los líquidos resultantes se acumularon en un frasco utilizado para desechos líquidos y eliminados.

6.8 Cálculo de la exposición a la AFM₁ en población infantil

Para determinar la exposición a AFM₁ en población infantil, la ingesta diaria estimada (IDE) se calculó de acuerdo con la ecuación propuesta por Quevedo-Garza et al., (2020). Los infantes se agruparon de acuerdo con la edad: 0 a 6 meses, 7 a 12 meses, 13 a 24 meses y 25 a 36 meses. La media de la ingesta de leche materna y el promedio de peso corporal fue obtenida de los datos reportados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 (ENSANUT) correspondientes al estado de Nuevo León.

De acuerdo con los grupos de edad de los infantes, la ingesta de leche se multiplica por la concentración de AFM₁ en la leche materna y luego se divide por el peso corporal de los bebés, como se indica en la siguiente fórmula:

$$\text{Ingesta diaria estimada de AFM}_1 \text{ (ng/kg/día)} = \frac{[\text{AFM}_1] \times [\text{Ingesta promedio de leche (L)}]}{\text{Peso corporal (kg)}}$$

Donde:

- AFM_1 = promedio de AFM_1 en las muestras analizadas expresadas en ng/L.
- Ingesta promedio de leche: ingesta diaria promedio, expresada en litros (tabla 2).
- Peso corporal (kg) = promedio de peso en la población infantil por grupos de edad (tabla 2).

Tabla 2. Estimación de consumo diaria de leche humana y/o fórmulas lácteas en lactantes y peso corporal promedio (PCP) por grupos de edad de acuerdo con la ENSANUT 2018 en N.L. (n= 123)

Edad (Meses)	Peso promedio			Ingesta promedio de leche
	Min – Max	Media	DS	Media (Lts/día)
0 a 6	2.5 – 11.70	6.5	1.61	1.98
7 a 12	4.25 – 13.83	8.99	1.3	2.35
13 a 24	4.35 – 31.95	10.93	1.88	2.37
25 a 36	5.80 – 25.48	13.24	2.042	2.02

Fuente: ENSANUT 2018.

6.9 Estimación del riesgo (IR) carcinogénico a AFM_1

Se estableció un índice de riesgo carcinogénico (IRC) para los lactantes que consumían AFM_1 , a través de la leche materna comparando los niveles de ingesta diaria estimada (EDI) de AFM_1 , frente a la ingesta diaria tolerable (IDT) de 2 ng/kg de peso/día, como se informó anteriormente por Kuiper–Goodman (1994) y Quevedo-Garza et al. (2020).

6.10 Variables de estudio

Aflatoxina M₁

Metabolito de la aflatoxina B₁ extremadamente tóxico derivado del hongo *aspergillus flavus* y *aspergillus parasiticus*, expulsado a través de la leche en humanos y animales.

Consumo medio de leche en lactantes

Es la ingesta de leche promedio consumida durante 24 horas por lactantes concorde a su edad en meses según la Encuesta Estatal de Salud y Nutrición (ENSANUT 2018).

Peso corporal promedio

Es el peso corporal promedio de acuerdo con la edad en meses de los lactantes del estado de Nuevo León.

Recordatorio de 24 horas

Es una herramienta para el análisis de la dieta. Consiste en la realización de una entrevista individual en la que se le solicita al participante recuerde todos los alimentos consumidos, como también la forma de preparación, aperitivos y bebidas ingeridas con preferencia al día anterior de la aplicación del instrumento. Se estima una duración de 20 a 30 minutos, en los cuales el personal de salud tiene la responsabilidad de indagar sobre las porciones ingeridas de cada alimento y marcas de productos empaquetados consumidos con la finalidad de favorecer a una estimación real en el consumo alimentario (Troncoso-Pantoja, Claudia et al., 2020).

El instrumento consta de un apartado inicial para la recopilación de información general de la participante y lactante. Se desglosan 5 tiempos de comida: desayuno, colación 1, comida, colación 2 y cena Se asegurará una adecuada obtención de los datos especificando en lo posible si el alimento fue cocinado en casa o se especificara el restaurante, como también los

ingredientes utilizados, método de cocción, porción de alimento y bebida ingerida (Anexo 2.)

Cuestionario semi-cuantitativa de frecuencia de alimentos

El cuestionario semi-cuantitativa de frecuencia de alimentos (CFCA) utilizado es un instrumento previamente validado con un apartado inicial sobre datos generales del entrevistado, con un total de 90 ítems divididos en 7 grupos de alimentos mediante tablas estandarizadas donde sistematizan la frecuencia de consumo en unidades de tiempo: nunca, día, semana y mes. Asimismo, se incluyen referencias de raciones/porciones estándar para cada alimento (Anexo 3).

Los grupos de alimentos están divididos de acuerdo con sus características nutricionales, de la siguiente manera: lácteos y derivados (12 ítems); frutos secos y oleaginosas (6 ítems); grasas (8 ítems); cereales y tubérculos (23 ítems); leguminosas (3 ítems); carnes, huevos, y embutidos (23 ítems); y bebidas (15 ítems).

El CFCA se realizó por los integrantes del grupo de investigación que acudían a la recolección de muestras a centros de salud en Monterrey, Nuevo León.

6.12 Plan de análisis estadístico

Se llevo a cabo un análisis estadístico con el programa SPSS versión 20 donde se incluyó un análisis descriptivo (media, desviación estándar, mínimo y máximo) de la concentración de AFM₁, estimación de ingesta diaria de AFM₁, y los componentes de la dieta obtenidos del Cuestionario Semicuantitativo de Frecuencia de Consumo de Alimentos. Debido a que la

muestra no presento normalidad por medio de una prueba de Kolmogorov-Smirnov el análisis de los datos obtenidos se desarrolló mediante una correlación no paramétrica de Spearman con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$).

Dentro del análisis se utilizaron variables:

- Cuantitativas: ingesta promedio de AFM₁, peso corporal promedio, ingesta de leche promedio por grupo de edad, estimación de la ingesta diaria de AFM₁, distribución de macronutrientes, descripción cuantitativa de la dieta por alimento y grupo.
- Cualitativa: evaluación de las características de la dieta en las madres participantes.

Planteamiento de hipótesis:

- H₀: Existe un posible riesgo carcinogénico en lactantes por presencia de aflatoxina M₁ en leche materna asociado al consumo de alimentos susceptibles de contaminación por aflatoxina M₁ en madres.
- H₁: No existe un posible riesgo carcinogénico en lactantes por presencia de aflatoxina M₁ en leche materna asociado al consumo de alimentos susceptibles de contaminación por aflatoxina M₁ en madres.

Tabla 3. Operacionalización de variables

OBJETIVO	VARIABLE	TIPO	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN	FUENTE DE INFORMACION
1. Estimar el índice de riesgo carcinogénico por grupo de edad de acuerdo con lo establecido por Kuiper-Goodman 1994.	Valor promedio de AFM ₁ encontrado por grupo de edad superior a 2 ng/kg.	Dependiente	IDT > 2ng/kg = Riesgo	Nominal	Kuiper-Goodman 1994
	Ingesta promedio de leche expresada en litros	Dependiente	Base de datos de la ENSANUT 2018 por grupo de edad	Intervalo	ENSANUT 2018
	Promedio de AFM ₁ que contienen las muestras	Independiente	Sumatoria de AFM ₁ en muestras / total de muestras = promedio	Intervalo	Muestras
	Peso corporal por grupo de edad	Independiente	Base de datos de la ENSANUT 2018 por grupo de edad	Intervalo	ENSANUT 2018
2. Evaluar el consumo de alimentos susceptibles de contaminación con aflatoxina M ₁ en las madres mediante cuestionario semi-cuantitativa de frecuencia de alimentos.	Ingesta promedio de alimentos	Independiente	Base de datos recolectada por el cuestionario de frecuencia de alimentos semicuantitativo.	Intervalo	Cuestionario de frecuencia de alimentos semicuantitativo.

<p>3. Asociar la presencia de aflatoxina M₁ en leche materna con el consumo de alimentos susceptibles de contaminación con aflatoxina M₁ de la madre.</p>	<p>Valor promedio de AFM₁ encontrado por participante</p>	<p>Dependiente</p>	<p>Ingesta diaria estimada= (ng/kg Peso/ día)</p>	<p>Nominal</p>	<p>Muestras y ENSANUT 2018</p>
	<p>Ingesta promedio de alimentos</p>	<p>Independiente</p>	<p>Base de datos recolectada por el cuestionario de frecuencia de alimentos semicuantitativo.</p>	<p>Intervalo</p>	<p>Cuestionario de frecuencia de alimentos semicuantitativo.</p>

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

Sin excepción los protocolos realizados en este proyecto de investigación fueron regidos por la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y Declaración de Helsinki de 1975 que dictaminan la clasificación de remanentes peligrosos biológico-infecciosos y especificaciones para su manejo.

Con motivo de la alta toxicidad atribuida a la AFM₁, el manejo de la muestra de leche materna cumplió con todos los procedimientos de seguridad. Todas las muestras analizadas fueron manejadas como si estuvieran contaminadas. El equipo de laboratorio porto en todo momento bata de laboratorio, guantes y cubrebocas desechables.

El área de trabajo fue desinfectada y tapizada con papel absorbente previo al análisis (J. Armijo C. y J. Calderón, 2009). Todos los materiales y equipo utilizado siguieron las indicaciones para la sanitización y los protocolos para neutralizar derrames y residuos de los extractos de las muestras, conforme con lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 que establece todo lo referente a productos lácteos y derivados.

Toda información proporcionada por las participantes se manejó con estricta confidencialidad, siendo utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos y los datos personales no podrán ser identificados. Las participantes deberán firmar un consentimiento informado (anexo 1) y en cualquier momento puede negarse o retirar su participación del presente estudio.

El protocolo experimental del presente proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Salud Pública y Nutrición y financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) 2021 con número de registro 21-FaSPyN-SA-08.

7. RECURSOS

Instalaciones

- Departamento de Química Analítica
- Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Materiales

Equipo

- A. Centrifuga c40 Solbat
- B. Espectrofotómetro Multiskan FC Thermo Scientific
- C. Micropipetas Eppendorf (10-100 µL)
- D. Software RIDA®SOFT Win.net (Art. No. Z9996) para RIDASCREEN® inmunoensayo enzimático R5812 FAST aflatoxin M₁

Materiales

- A. Hoja de consentimiento informado y recordatorio de 24 horas impreso
- B. 123 frascos de vidrio (45 ml) estériles.
- C. Hielera
- D. Hielo
- E. Etiquetas adhesivas para identificación
- F. Kit RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁ de R-Biopharm AG (Alemania)

8. RESULTADOS

Concentración de AFM₁

En cuanto a la presencia de AFM₁ en la leche materna, la toxina se detectó en el 100% de las muestras estudiadas (n = 123), resultados similares a los reportados en estudios previos en otros países (Hernández, M. 2021).

Para el análisis estadístico de la concentración de AFM₁ se agrupó a los lactantes en 4 grupos de acuerdo con la edad para evaluar la media, desviación estándar, valores mínimos y máximos, como se muestra en la **Tabla 4**.

La concentración media de AFM₁ de las muestras de leche identificada por en el ensayo inmunoenzimático con el Kit RIDASCREEN®FAST Aflatoxin M₁ de R-Biopharm AG (Alemania) fue de 17,04 ± 9,13 ng/L y varió de 5,00 a 66,23 ng/L.

Por otro lado, se observó que las muestras de leche materna recolectadas de madres lactantes en diferentes etapas de la lactancia (grupos de edad) mostraron contenidos similares de AFM₁ en los grupos de 0 a 24 meses de edad, mientras que el contenido de AFM₁ de la leche materna en los grupos de 25 a 36 meses presentó el nivel medio más bajo, aunque estas diferencias no fueron significativas.

Tabla 4. Concentración de AFM₁ por grupo de edad (n=123)

Grupo de edad (meses)	n (%) *	AFM ₁ (ng/L)	
		Media ± DS	Min - Max
0 a 6	86	16.68 ± 9.66	5.00 – 66.23
7 a 12	18	17.92 ± 8.45	5.00 – 38.26
13 a 24	16	18.96 ± 7.49	5.00 – 29.21
25 a 36	3	11.96 ± 3.46	8.16 – 14.93
Total	123	17.0420 ± 9.13	5.00 – 66.23

*n = al número de muestras de leche materna colectadas divididas por grupo de edad. El valor en paréntesis indica el porcentaje de muestras que superan el límite establecido por la Unión Europea (25 ng/L) con respecto del total.

Estimación de la ingesta diaria de AFM₁ y potencial riesgo carcinogénico

Para el análisis estadístico de la ingesta diaria estimada de AFM₁ e índice de riesgo carcinogénico los lactantes se agruparon en 4 grupos de edad y se tomaron en cuenta los niveles medios por grupo de edad de AFM₁ reportados en la **tabla 4**, el peso corporal y la ingesta de leche en los infantes reportados en la **tabla 2** basados en la ENSANUT 2018.

La **Tabla 5** muestra la ingesta diaria estimada (IDE; media, desviación estándar, valores mínimos y máximos) de AFM₁ a través de la leche materna, y el índice de riesgo carcinogénico (IRC) según la ecuación propuesta por Kuiper-Goodman (1994). Los valores IDE oscilaron entre 1,81 y 5,08 ng/kg de peso/día.

El grupo más joven, de 0 a 6 meses, presentó los valores más altos de IDE de AFM₁, lo que demuestra la susceptibilidad de este grupo de lactantes. Los valores de la IDE disminuyeron ligeramente en los siguientes grupos de edad, siendo el grupo de lactantes de 25 a 36 meses el de menor exposición, debido a un mayor peso corporal y un menor consumo de leche materna. La ingesta de AFM₁ fue superior al IRC de 2 ng/kg peso/día en lactantes de 0 a 24 meses de edad, lo que indica un alto riesgo de exposición a AFM₁ para la población infantil del noreste de México según lo propuesto por Kuiper-Goodman (1994).

Tabla 5. Ingesta Diaria Estimada (IDE) de aflatoxina M1 y el índice de riesgo carcinogénico (IRC) según al grupo de edad infantil (n=123)

Grupo de edad (Meses)	Peso corporal (kg)	Ingesta de leche (L/día)	IDE (ng/kg Peso/ día)		IRC * (2 ng/kg peso/ día)
			Media	Min-Max	
0 a 6	6.50	1.98	5.08 ± 2.94	1.52 – 20.18	Riesgo
7 a 12	8.99	2.35	4.68 ± 2.21	1.31 – 9.98	Riesgo
13 – 24	10.93	2.37	4.10 ± 1.62	1.08 – 6.33	Riesgo
25 a 36	13.24	2.02	1.81 ± 0.52	1.25 – 2.28	Potencial riesgo

*IRC: índice de riesgo carcinogénico, reportado por Kuiper-Goodman (1994) y Quevedo-Garza et al., (2020).

Cuestionario Semicuantitativo de Frecuencia alimentaria

En lo que respecta a la estimación de la dieta de las madres se llevó a cabo un análisis estadístico de la ingesta calórica arrojando un valor medio de 2929.95 kcal/día. Posteriormente se realizó un análisis del porcentaje de distribución de macronutrientes obteniendo los siguientes valores: proteína total 17%, carbohidratos 53%, lípidos 30% y una ingesta promedio de agua natural de 2092 ml como se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Estimación de ingesta dietética diaria de macronutrientes en gramos según el cuestionario semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos.

	Media	Desviación estándar	Mín-Max	%
Kcal totales	2929.94	1374.40	1007.30 - 8056.70	100
Proteína total (g/día)	124.70	62.22	34.09 - 331.22	17 ± 2.73
Carbohidratos totales (g/día)	391.03	186.33	80.34 - 1021.83	53 ± 5.25
Lípidos totales (g/día)	97.55	50.41	36.88 - 354.78	30 ± 7.45
Agua (ml/día)	2092	925	240 - 4800	-

Se continuo con un análisis estadístico del porcentaje calórico ingerido por grupo de alimentos. Siendo cereales y tubérculos (47.34%), carnes (19.13%), lácteos y derivados (10.05%) los grupos con un mayor consumo según la ingesta calórica total. A la inversa, en su mayoría reporto un bajo consumo de frutos secos y oleaginosas (1.14%) y bebidas alcohólicas (0.29%) reportados en la **Tabla 7**.

Por último, se llevaron los cálculos correspondientes para conocer los alimentos que se consumían en mayor proporción en las participantes. Dentro del grupo de los cereales los alimentos consumidos con mayor proporción fueron la tortilla de maíz, arroz, pastas, papa, pan y galletas dulces; en el grupo de los lácteos y derivados los principales alimentos fueron la leche entera, yogurt y queso de vaca; en el caso del grupo de las carnes fueron huevo, carne de res, pechuga de pollo, chorizo y pierna de pollo.

Tabla 7. Estimación del porcentaje de distribución de calorías totales por grupo de alimentos según frecuencia semicuatitativa de consumo de alimentos

Grupo de alimentos	Media	Min – Max
Lácteos y derivados	10.05 ± 6.79	0 – 40.97
Frutos secos	1.14 ± 1.67	0 – 8.41
Grasas	7.95 ± 3.12	3.39 – 19.71
Carnes	19.13 ± 7.77	2.11 – 49.91
Cereales y tubérculos	47.34 ± 10.38	22.87 – 74.26
Leguminosas	6.94 ± 5.85	0 – 37.86
Bebidas azucaradas	7.16 ± 6.03	0 – 32.68
Bebidas alcohólicas	0.29 ± 1.09	0 – 8.84

Correlación de alimentación y AFM₁ en leche materna

Se realizó en primera instancia una prueba de normalidad, la cual no se cumplió por lo que se optó por una prueba no paramétrica Rho de Spearman Bilateral para realizar los análisis estadísticos sobre la correlación de alimentación y AFM₁ en leche materna.

Se llevo determino el consumo medio, desviación estándar, valores mínimos y máximos y la correlación de la concentración de AFM₁ en leche materna y los gramos/mililitros de todos los alimentos que se enlistaron en el CFCA.

Se obtuvo una correlación significativa (0.05) para los siguientes alimentos: té o infusiones, pierna de pollo, cerveza, jamón de pavo, bolillo, alita de pollo, cacahuates/habas/pepitas, leche en polvo Liconsa y pistaches. Enlistados de mayor a menor consumo en las madres participantes (**Tabla 8**).

Por el contrario, la edad de las madres y lactantes, el consumo de calorías, proteína, carbohidratos y lípidos de las participantes no se correlaciono con la concentración final de AFM₁.

Tabla 8. Alimentos con relación a la concentración de Aflatoxina M1 en leche materna.

Alimento (g o ml)	Consumo media \pm DE***	Min – Max	Sig. Bilateral (Rho de Spearman)
Té o infusiones	36.08 \pm 91.30	0 – 720.00	0.015*
Pierna de pollo	26.28 \pm 31.72	0 – 108.00	0.044*
Cerveza	20.25 \pm 79.00	0 – 610.30	0.034*
Jamón de pavo	14.08 \pm 15.87	0 – 84.00	0.032*
Bolillo	12.34 \pm 20.86	0 – 120.00	0.016*
Alita de pollo	5.13 \pm 20.21	0 – 204.00	0.026*
Cacahuates/habas/pepitas	2.27 \pm 3.90	0 – 24.00	0.037*
Leche en polvo Liconsa	0.29 \pm 2.29	0 – 24.00	0.048*
Pistaches	0.28 \pm 1.36	0 – 13.00	0.003**

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral)

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral)

***DE = desviación estándar

9. DISCUSIÓN

La leche materna es considerada el mejor alimento que un infante puede recibir para su correcto crecimiento y desarrollo. El cual no cumple con una composición uniforme, sino que presenta variabilidad que puede estar relacionada con la etapa de lactación, hora del día, necesidades propias del infante o alimentación materna (Anatolitou, 2012 y Cantu-Cornelio, 2016). En consecuencia, el estudio del biofluido es de gran interés por los beneficios o riesgos a la salud infantil que se puedan presentar.

Por consiguiente, en el presente estudio se evaluó la presencia de aflatoxina M₁ en leche materna y se detectó su presencia en el 100% de las muestras (n=123) con niveles de contaminación en el rango de 5.00 a 66.23 ng/L. Similar a lo obtenido en países como Gambia y Tanzania (Zinedine et al., 2021), Irán (Azarikia et al., 2018), las tierras altas de Ecuador (Ortiz et al., 2018), Jordania (Omar, 2012) y México (Cantú C. et al., 2014). Mientras que se informaron ocurrencias medias o bajas en Portugal (33 %), Ghana (22 %), Italia y Camerún (5 %) y Brasil (4 %) (Bogalho et al., 2018; Galvano et al., 2008; Tchana et al., 2010 y Ishikawa et al., 2016). En relación con los resultados obtenidos por grupo de edad no se presentó diferencia significativa por lo que la exposición del lactante es similar a lo largo de los primeros 36 meses de vida.

Por otro lado, existen estudios limitados que estiman la ingesta diaria de AFM₁ en lactantes. En el presente se obtuvo un IDE promedio de 4.81 ± 2.72 ng/kg peso/día semejante a los reportados en el centro de México (0.92–6.28 ng/kg peso/día) (Cantú-Cornelio et al., 2016) y superiores a los encontrados en el Líbano (0.65–0.80 ng/kg peso/día) (Abdulrazzaq et al., 2002) o Marruecos (0,35 ng/kg peso/día) (Cherkani-Hassani et al., 2020), pero inferiores a los registrados en Egipto (52,68 ng/kg peso/día) (El-Tras et al., 2011) o Tanzania (11,08 ng/kg peso/día) (Magoha et al., 2014). Del total de muestras analizadas solamente el 13,01% superó el límite de tolerancia de 25 ng/L establecido por la Comisión Europea para fórmulas infantiles.

Con respecto a la presencia de AFM₁ en la leche materna se ha reportado una relación directa con los hábitos de consumo de alimentos de las madres lactante

siendo las dietas compuestas por cereales, especias, semillas, aceites y nueces, y productos de leche de vaca pueden estar contaminados con AFB₁ y AFM₁ en mayor o menor grado dependiendo de varias condiciones ambientales, de almacenamiento y climáticas que pueden afectar la producción de AFM₁ y la contaminación de alimentos con AFB₁ (Hernández, M. et al., 2021).

En efecto en el presente estudio se encontró una relación positiva en la concentración de AFM₁ en leche materna y el consumo de los siguientes alimentos: té o infusiones, pierna de pollo, cerveza, jamón de pavo, bolillo, alita de pollo, cacahuates/habas/pepitas, leche en polvo Liconsa y pistaches con un valor de significación del 95% – 99% (enlistados de mayor a menor consumo).

10. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

Las muestras de leche materna analizadas de madres lactantes de la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México presento una alta incidencia de contaminación (100%) en un rango de 5.00 a 66.23 ng/L, de las cuales el 13, 01% mostro niveles AFM₁ superiores a los límites superiores (25 ng/L) establecidos por la Unión Europea. Con base en el peso corporal promedio del bebé y la ingesta promedio de leche materna, se estimó la ingesta diaria de AFM₁ y el índice de riesgo carcinogénico en bebés de 0 a 36 meses de edad, y se determinó que los bebés de 0 a 24 meses de edad están en riesgo carcinogénico por exposición a AFM₁ por consumo de leche materna contaminada. Estos datos indican que las madres lactantes en el noreste de México tienen una alta exposición a AFB₁ y/o AFM₁ a través de la dieta.

Se sugiere que la presencia de AFM₁ en leche materna está relacionada con la ingesta materna de té o infusiones, pierna de pollo, cerveza, jamón de pavo, bolillo, alita de pollo, cacahuates/habas/pepitas, leche en polvo Liconsa y pistaches con un valor de significación del 95%.

Se considera crucial resaltar que la leche materna sigue siendo considerada el mejor alimento que un infante puede recibir por las implicaciones positivas e incomparables que aporta al desarrollo infantil. Esta evidencia respalda fuertemente la necesidad de establecer programas de salud pública para brindar educación nutricional a las mujeres antes y durante los períodos de lactancia, con la finalidad de seleccionar alimentos que reduzcan la exposición a AFM₁ y se minimice su paso por la leche materna.

Es importante continuar profundizando en el tema con estudios en diferentes áreas geográficas del país y épocas del año que permitan el desarrollo de nuevos conocimientos en favor a la salud pública. La presente investigación ha publicado nuevos conocimientos en la revista Toxins con un factor de impacto de impacto de 4,8 con clasificación en la categoría JCR 32/144 (Q1) en Ciencia & Tecnología de los Alimentos y 21/93 (Q1) en Toxicología (ANEXO 6).

11. REFERENCIAS

Abdulrazzaq, Y., Osman, N., & Ibrahim, A. (2002). Fetal exposure to aflatoxins in the United Arab Emirates. *Annals Of Tropical Paediatrics*, 22(1), 3-9. <https://doi.org/10.1179/027249302125000094>

Anatolitou, F. (2012). Human milk benefits and breastfeeding. *Journal Of Pediatric And Neonatal Individualized Medicine*, 1(1), 11-18. doi: 10.7363/010113

Apeageyi, F., Lamplugh, S.M., Hendrickse, R.G., Afframy, K. y Lucas, S. Anatoxins in the liver of children with kwashiorkor in Ghana. *Trop. Geogr. Med. Home* 9-12 (1982).

Azarikia, M., Mahdavi, R., & Nikniaz, L. (2018). Occurrence and dietary factors associated with the presence of aflatoxin B1 and M1 in breast milk of nursing mothers in Iran. *Food Control*, 86, 207-213. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.009>

Ballard, O., y Morrow, A. (2013). Human Milk Composition. *Pediatric Clinics Of North America*, 60(1), 49-74. doi: 10.1016/j.pcl.2012.10.002

Bogalho, F., Duarte, S., Cardoso, M., Almeida, A., Cabeças, R., Lino, C., & Pena, A. (2018). Exposure assessment of Portuguese infants to Aflatoxin M1 in breast milk and maternal social-demographical and food consumption determinants. *Food Control*, 90, 140-145. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.043>

Bogantes- Ledezma, Pilar, Bogantes-Ledezma, Diego, y Bogantes- Ledezma, Sixto. (2004). Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*, 46(4), 174-178. Retrieved April 08, 2021, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022004000400004&lng=en&tlng=es.

Boudry, G., Charton, E., Le Huerou-Luron, I., Ferret-Bernard, S., Le Gall, S., Even, S., y Blat, S. (2021). The Relationship Between Breast Milk Components and the Infant Gut Microbiota. *Frontiers In Nutrition*, 8. doi: 10.3389/fnut.2021.629740

Cantú-Cornelio, F., Aguilar-Toalá, J., de León-Rodríguez, C., Esparza-Romero, J., Vallejo-Cordoba, B., & González-Córdova, A. et al. (2016). Occurrence and factors associated with the presence of aflatoxin M1 in breast milk samples of nursing mothers in central Mexico. *Food Control*, 62, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.004>

Carrillo, L., y Audisio, M. (2007). *Manual de Microbiología de Alimentos* (Primera ed.). San Salvador de Juy, Argentina: Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Carvajal M. (2013). Transformación de la aflatoxina B₁ de alimentos, en el cancerígeno humano aducto AFB₁-ADN. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas UNAM 16:109-120.

Cherkani-Hassani, A., Ghanname, I., Zinedine, A., Sefrioui, H., Qmichou, Z., & Mouane, N. (2020). Aflatoxin M1 prevalence in breast milk in Morocco: Associated factors and health risk assessment of newborns "CONTAMILK study". *Toxicon*, 187, 203-208. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.09.008>

Diario Oficial de la Federación, 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y Servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Métodos de prueba.

El-Tras, W., El-Kady, N., & Tayel, A. (2011). Infants exposure to aflatoxin M1 as a novel foodborne zoonosis. *Food And Chemical Toxicology*, 49(11), 2816-2819. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.008>

Elaridi, J., Bassil, M., Kharma, J., Daou, F., y Hassan, H. (2017). Analysis of Aflatoxin M1 in Breast Milk and Its Association with Nutritional and Socioeconomic Status of Lactating Mothers in Lebanon. *Journal Of Food Protection*, 80(10), 1737-1741. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-17-083.

European Commission. (2006). Commission regulation (EC) no 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L 364, 5e24.

Fakhri, Y., Rahmani, J., Oliveira, C.A.F., Franco, L.T., Corassin, C.H., Saba, S., Rafique, J., y Khaneghah, A.M. (2019). *Aflatoxin M1 in human breast milk: a global systematic review, metaanalysis, and risk assessment study (Monte Carlo simulation)*. Trends in Food Science & Technology, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.013>.

FAO/OMS.(2003). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en alimentos y en las raciones en el año 2003. Estudio FAO: Alimentación y Nutrición 81. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. Italia.

Frisvad, J., Hubka, V., Ezekiel, C., Hong, S., Nováková, A., y Chen, A. et al. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies In Mycology*, 93, 1-63. doi: 10.1016/j.simyco.2018.06.001

Fu Z., Huang X., y Mina S. (2008). Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *Journal of Chromatography*. 271-274.

Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Gagliardi, L., Ciotti, S., & Luisi, S. et al. (2008). Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(4), 496-501. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700266>

Gartner LM, Morton J, y Lawrence RA. (2005). American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*;115 (2):496–506

Gong, Y., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P. C., Sutcliffe, A. E., Hall, A. J., Wild, C. P. (2004). Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: A

longitudinal study in Benin, West Africa. *Environmental Health Perspectives*, 1334-1338. doi: 10.1289/ehp.6954.

Goni Mateos, Leticia, Aray Miranda, Maritza, Martínez H., Alfredo, y Cuervo Zapatel, Marta. (2016). Validación de un cuestionario de frecuencia de consumo de grupos de alimentos basado en un sistema de intercambios. *Nutrición Hospitalaria*, 33(6), 1391-1399. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.800>

Gross-Steinmeyer, K. y Eaton, D.L. (2012) Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B(1). *Toxicology*, 299, 69-79.

Guideline - American Academy of Pediatrics. Section on Breastfeeding, (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 129(3):e827-41.

Guzman-Perez Aleida. (2019). Determinar la exposición en lactantes a aflatoxina m1 en muestras de leche materna en población de Monterrey (México) y su potencial riesgo asociado a su consumo. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Hernández, M.; Juan, A.; Moltó, J.C.; Mañes, J.; Juan, C. Evaluation of mycotoxins in infant breast milk and infant food, reviewing the literature data. *Toxins* 2021, 13, 535. [CrossRef] [PubMed]

Herrera Querol Laura. (2012). Puesta a punto y validación de un método de análisis de aflatoxina en frutos secos y cereales. Universidad Zaragoza. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.05.016>

International Agency for Research on Cancer. (2012). *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human*. Monografía, World Health Organization.

International Agency for Research on Cancer., World Health Organization., y IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2002). *Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1017-1606 ; v. 82)*. International Agency for Research on Cancer.

Ishikawa, A., Takabayashi-Yamashita, C., Ono, E., Bagatin, A., Rigobello, F., & Kawamura, O. et al. (2016). Exposure Assessment of Infants to Aflatoxin M1 through Consumption of Breast Milk and Infant Powdered Milk in Brazil. *Toxins*, 8(9), 246. <https://doi.org/10.3390/toxins8090246>

Islam, F., Das Trisha, A., Hafsa, J., Hasan, A., Degen, G., y Ali, N. (2021). Occurrence of aflatoxin M1 in human breast milk in Bangladesh. *Mycotoxin Research*, 37(3), 241-248. doi: 10.1007/s12550-021-00436-w

Ismail, A., Gonçalves, B., de Neeff, D., Ponzilacqua, B., Coppa, C., y Hintzsche, H. (2018). Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. *Food Research International*, 113, 74-85. doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.067

J. Armijo C. y J. Calderón. (2009). Esquema de acciones a evitar, controlar y desinfectar productos de hongos y aflatoxinas. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.* Vol. 12 N.º 2, 2009. Págs. 15-24.

Knutsen, H., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., y Ceccatelli, S. et al. (2018). Effect on public health of a possible increase of the maximum level for 'aflatoxin total' from 4 to 10 µg/kg in peanuts and processed products thereof, intended for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuffs. *EFSA Journal*, 16(2). doi: 10.2903/j.efsa.2018.5175

Krska, R., Richard, J., Schuhmacher, R., Slate, A., y Whitaker, T. (2012). *Guide to mycotoxins* (4th ed.). Austria: Romer Labs.

Kuiper-Goodman, T. (1990). Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1017-1024.

Kumar, P., Mahato, D., Kamle, M., Mohanta, T., y Kang, S. (2017). Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Frontiers In Microbiology*, 07. doi: 10.3389/fmicb.2016.02170

Landeros P., Noa M., Lopez Y., Gonzalez D., Noa E., Reak M., Juarez C. y Medina M. (2012). Niveles de aflatoxina M1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México. *Revista de Salud Animal*, 34(1), 40-45.

Lawrence RA y Lawrence RM. (2016). *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession*. 8th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier.

Magoha, H., Kimanya, M., De Meulenaer, B., Roberfroid, D., Lachat, C., & Kolsteren, P. (2014). Association between aflatoxin M₁ exposure through breast milk and growth impairment in infants from Northern Tanzania. *World Mycotoxin Journal*, 7(3), 277-284. <https://doi.org/10.3920/wmj2014.1705>

Martínez MM, Vargas del Río LM. y Gómez VM. (2013). Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*; 12(2): 89-109.

Martínez-Padrón, H. Y., Hernández Delgado, S., Reyes Méndez , C., y Vázquez Carrillo, G. (2013). El género *aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: problemática y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*.

Medina B. Juan Carlos y Eliezer Castillo. (1994). *Control de Calidad de Insumos y Dietas Acuicolas*. Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentacion - FAO.

Mosca F, Gianni ML. (2017). Human milk: composition and health benefits. *Pediatr Med Chir*. 28;39(2):155. doi: 10.4081/pmc.2017.155. PMID: 28673076.

Omar, S. (2012). Incidence of Aflatoxin M1 in Human and Animal Milk in Jordan. *Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part A*, 75(22-23), 1404-1409. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.721174>

Organización Mundial de la Salud. (2011). Organización Mundial de la Salud. Obtenido de

OMS: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2011/breastfeeding_20110115/es/

Organización Mundial de la Salud. (2018). Aflatoxinas. Obtenido de: https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_SP.pdf

Organización Mundial de la Salud. (2018). Mycotoxins. Obtenido de: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins#:~:text=Mycotoxins%20are%20naturally%20occurring%20oxins,under%20warm%20and%20humid%20conditions.>

Ortiz, J., Jacxsens, L., Astudillo, G., Ballesteros, A., Donoso, S., Huybregts, L., & De Meulenaer, B. (2018). Multiple mycotoxin exposure of infants and young children via breastfeeding and complementary/weaning foods consumption in Ecuadorian highlands. *Food And Chemical Toxicology*, 118, 541-548. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.008>

Ostry, V., Malir, F., Toman, J., y Grosse, Y. (2016). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33(1), 65-73. doi: 10.1007/s12550-016-0265-7

Picaud, Jean-Charles y Buffin, Rachel (2017). *Human Milk—Treatment and Quality of Banked Human Milk. Clinics in Perinatology*, 44(1), 95–119. doi:10.1016/j.clp.2016.11.003

Quevedo-Garza, P. A., Amador-Espejo, G. G., Salas-García, R., Ramos-Peña, E. G., & Trujillo, A. J. (2020). Aflatoxin M1 determination in infant formulae distributed in Monterrey, Mexico. *Toxins*, 12(2), 100.

R-Biopharm. (2018). *r-Biopharm*. Alemania. Obtenido de <https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/2/2016/03/R1121-Aflatoxin-M1-15-09-15.pdf>

Radonić, J., Kocić Tanackov, S., Mihajlović, I., Grujić, Z., Vojinović Miloradov, M., Škrinjar, M., y Turk Sekulić, M. (2016). Occurrence of aflatoxin M1 in human milk

samples in Vojvodina, Serbia: Estimation of average daily intake by babies. *Journal Of Environmental Science And Health, Part B*, 52(1), 59-63. doi: 10.1080/03601234.2016.1229454

Rangel-Muñoz, E., Valdivia-Flores, A., Moreno-Rico, O., Hernández-Delgado, S., Cruz-Vázquez, C., y De-Luna-López, M. et al. (2020). Caracterización de *Aspergillus Flavus* y cuantificación de aflatoxinas en pienso y leche cruda de vacas en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 11(2), 435-454. doi: 10.22319/rmcp.v11i2.5686

Sadeghi, N., Oveisi, M., Jannat, B., Hajimahmoodi, M., Bonyani, H., y Jannat, F. (2009). Incidence of aflatoxin M1 in human breast milk in Tehran, Iran. *Food Control*, 20(1), 75-78. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.02.005

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección—Salud Ambiental—Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos—Clasificación y Especificaciones de Manejo, Última revisión: Enero 2003. Disponible en línea: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=704675&fecha=17/02/2003#:~:}text=NORMA%20Oficial%20Mexicana%20NOM%2D087,Medio%20Ambiente%20y%20Recursos%20Naturales (acceso 18 de mayo 2022).

Shah R, Sabir S. y Alhawaj AF. (2020). Physiology, Breast Milk. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539790>

Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Romero-Martínez M, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L, Santaella-Castell JA y yRivera-Dommarco J. (2018) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2020.

Tchana, A., Moundipa, P., & Tchouanguep, F. (2010). Aflatoxin Contamination in Food and Body Fluids in Relation to Malnutrition and Cancer Status in

Cameroon. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 7(1), 178-188. <https://doi.org/10.3390/ijerph7010178>

Troncoso-Pantoja, Claudia, Alarcón-Riveros, Mari, Amaya-Placencia, Juan, Sotomayor-Castro, Mauricio, y Maury-Sintjago, Eduard. (2020). Guía práctica de aplicación del método dietético para el diagnóstico nutricional integrado. *Revista chilena de nutrición*, 47(3), 493-502. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182020000300493>

Victora, C., Bahl, R., Barros, A., França, G., Horton, S., y Krasevec, J. et al. (2016). Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *The Lancet*, 387(10017), 475-490. doi: 10.1016/s0140-6736(15)01024-7

Wagner Carol L. et al., (2021). Human Milk and Lactation. Medscape. URL: <https://emedicine.medscape.com/article/1835675-print>

Wild C.P., y Montesano R.A. (2009). Model of interaction: aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. *Cancer Letters*. 286:22-28.

Winter, G. y Pereg, L. (2019). A Review on the Relation between Soil and Mycotoxins: Effect of Aflatoxin on Field, Food and Finance. *Eur. J. Soil Sci.* 70, 882–897.

Yalçın Sıddıka Songül, Güneş Bülent y Yalçın Suzan. (2020). Influence of season and lactational stage on aflatoxin M1 and ochratoxin A in human milk in a cohort study from southeastern region of Turkey, *International Journal of Environmental Health Research*, DOI: 10.1080/09603123.2020.1860200

Zain M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15(2):129-144.

Zinedine, A., Ben Salah-Abbes, J., Abbès, S., & Tantaoui-Elaraki, A. (2021). Aflatoxin M1 in Africa: Exposure Assessment, Regulations, and Prevention Strategies – A Review. *Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology*, 73-108. https://doi.org/10.1007/398_2021_73

Zumbado, C., Ulloa, M., y Rojas, G. (2014). Aflatoxina B1 y su relación con el desarrollo de cáncer hepático. *Revista Médica De Costa Rica Y Centroamérica*, LXXI(612).

12. ANEXOS

ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



DETERMINACIÓN DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE MATERNA ASOCIADO A LA INGESTA DIETÉTICA DE LAS MADRES Y EL POTENCIAL RIESGO CARCINOGENÉTICO ASOCIADO A SU CONSUMO EN LACTANTES DE MONTERREY, N.L. MÉXICO.

El objetivo del presente es el análisis y evaluación de muestras de leche materna para la determinación de aflatoxinas y su relación con la ingesta de alimentos como parte de un proyecto de investigación en la Maestría en Ciencias en Nutrición en el Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública de la Facultad de Salud Pública y Nutrición.

Se solicita su valiosa participación con la extracción voluntaria de de 10-15 ml de leche materna para su posterior análisis en laboratorio. Su participación en el presente estudio no implica para usted ningún riesgo y toda la información proporcionada será estrictamente confidencial, utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos y los datos personales no podrán ser identificados. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación del mismo en cualquier momento.

Como beneficio directo por su participación en el estudio recibirá asesoramiento en temas de nutrición y su colaboración con la presente investigación servirá para el desarrollo y avance de la investigación en nutrición y salud pública del estado de Nuevo León. Si acepta participar, le entregaremos una copia de este documento que le pedimos sea tan amable de firmar.

Nombre del participante

Firma del participante

Lugar y fecha

ANEXO 2. RECORDATORIO DE 24 HORAS



FOLIO

ENCUESTA ALIMENTARIA - RECORDATORIO DE 24 HORAS

Nombre entrevistador: _____	Fecha (d/m/a): ____/____/____
------------------------------------	--------------------------------------

DATOS GENERALES DEL PARTICIPANTE

Nombre entrevistado: _____	Fec. nac. (d/m/a): ____/____/____	Edad (años) _____	
Edad lactante (m): _____	Fec. nac. lactante (d/m/a): ____/____/____	Centro de salud _____	

Instrucciones:

1. El entrevistador debe preguntar al entrevistado sobre todo lo que consume en un día, desde el primer alimento en la mañana hasta lo último que consume terminando el día.
2. Se debe de contestar en cada pregunta lo más específico posible, debe de ponerse cada ingrediente que utilizó el entrevistado y la bebida, por ejemplo, si tomó agua natural, de sabor, refresco, etc., y también no olvidarse de preguntar la cantidad que consumió, si fue un vaso o dos, una lata, etc.
3. En el caso del endulzante, si el entrevistado no sabe qué es, se pueden mencionar los ejemplos que vienen marcados en el catálogo (si utilizó **Sweet** azúcar blanca, piloncillo, etc.) así como la cantidad que utilizó si fue 1 sobre, 2 cucharadas, 2 cucharaditas, etc.)
4. Se brindará una lista de apoyo en donde se plasman los tiempos de comida, medidas caseras y los gramos a los que equivalen, los tipos de método de cocción y los tipos de endulzantes que pueden utilizar en sus bebidas
5. En caso de que el entrevistado no se acuerde la cantidad exacta del alimento que utilizó para su preparación, lo pueden ayudar con una cantidad aproximada recordando las medidas, por ejemplo, si fue una taza, una cuchara, 1 sobre, etc. Si no, se puede dejar en blanco.

Tiempo de comida	Platillo e ingredientes	Cantidad (medida casera/gr/ml)	Método de cocción	Bebida
DESAYUNO Hora: _____ Lugar: <input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Fuera de casa	Platillo: _____ Ingredientes: _____ _____ _____ _____ _____ _____ Marcas/restaurantes: _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	<input type="checkbox"/> Vapor <input type="checkbox"/> Horno <input type="checkbox"/> A la plancha <input type="checkbox"/> Freído <input type="checkbox"/> Asado <input type="checkbox"/> Cocido <input type="checkbox"/> Guisado <input type="checkbox"/> Braseado <input type="checkbox"/> Otro: _____	<input type="checkbox"/> Agua: _____ ml <input type="checkbox"/> Refrescos: _____ ml <input type="checkbox"/> Jugos naturales: _____ ml <input type="checkbox"/> Jugos embotellados: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas en base de polvo: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas deportivas: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas energizantes: _____ ml <input type="checkbox"/> Café: _____ ml <input type="checkbox"/> Té: _____ ml <input type="checkbox"/> Cerveza: _____ ml <input type="checkbox"/> Alcohol: _____ ml <input type="checkbox"/> Vino tinto: _____ ml <input type="checkbox"/> Leche: _____ ml <input type="checkbox"/> Leche con sabor: _____ ml Marcas: _____ _____

Tiempo de comida	Platillo e ingredientes	Cantidad (medida casera/gr/ml)	Método de cocción	Bebida
Colación 1 Hora: _____ Lugar: <input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Fuera de casa	Platillo: _____ Ingredientes: _____ _____ _____ _____ _____ Marcas/restaurantes: _____ _____	_____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	<input type="checkbox"/> Vapor <input type="checkbox"/> Horno <input type="checkbox"/> A la plancha <input type="checkbox"/> Freído <input type="checkbox"/> Asado <input type="checkbox"/> Cocido <input type="checkbox"/> Guisado <input type="checkbox"/> Braseado <input type="checkbox"/> Otro: _____	<input type="checkbox"/> Agua: _____ ml <input type="checkbox"/> Refrescos: _____ ml <input type="checkbox"/> Jugos naturales: _____ ml <input type="checkbox"/> Jugos embotellados: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas en base de polvo: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas deportivas: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas energizantes: _____ ml <input type="checkbox"/> Café: _____ ml <input type="checkbox"/> Té: _____ ml <input type="checkbox"/> Cerveza: _____ ml <input type="checkbox"/> Alcohol: _____ ml <input type="checkbox"/> Vino tinto: _____ ml <input type="checkbox"/> Leche: _____ ml <input type="checkbox"/> Leche con sabor: _____ ml Marcas: _____ _____

Tiempo de comida	Platillo e ingredientes	Cantidad (medida casera/gr/ml)	Método de cocción	Bebida
COMIDA Hora: <hr/> Lugar: <input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Fuera de casa	Platillo: _____ Ingredientes: <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> Marcas/restaurantes: <hr/> <hr/>	<hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>	<input type="checkbox"/> Vapor <input type="checkbox"/> Horno <input type="checkbox"/> A la plancha <input type="checkbox"/> Freído <input type="checkbox"/> Asado <input type="checkbox"/> Cocido <input type="checkbox"/> Guisado <input type="checkbox"/> Braseado <input type="checkbox"/> Otro: _____	<input type="checkbox"/> Agua: _____ ml <input type="checkbox"/> Refrescos: _____ ml <input type="checkbox"/> Jugos naturales: _____ ml <input type="checkbox"/> Jugos embotellados: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas en base de polvo: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas deportivas: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas energizantes: _____ ml <input type="checkbox"/> Café: _____ ml <input type="checkbox"/> Té: _____ ml <input type="checkbox"/> Cerveza: _____ ml <input type="checkbox"/> Alcohol: _____ ml <input type="checkbox"/> Vino tinto: _____ ml <input type="checkbox"/> Leche: _____ ml <input type="checkbox"/> Leche con sabor: _____ ml Marcas: <hr/> <hr/>
COLACIÓN 2 Hora: <hr/> Lugar: <input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Fuera de casa	Platillo: _____ Ingredientes: <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> Marcas/restaurantes: <hr/> <hr/>	<hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>	<input type="checkbox"/> Vapor <input type="checkbox"/> Horno <input type="checkbox"/> A la plancha <input type="checkbox"/> Freído <input type="checkbox"/> Asado <input type="checkbox"/> Cocido <input type="checkbox"/> Guisado <input type="checkbox"/> Braseado <input type="checkbox"/> Otro: _____	<input type="checkbox"/> Agua: _____ ml <input type="checkbox"/> Refrescos: _____ ml <input type="checkbox"/> Jugos naturales: _____ ml <input type="checkbox"/> Jugos embotellados: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas en base de polvo: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas deportivas: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas energizantes: _____ ml <input type="checkbox"/> Café: _____ ml <input type="checkbox"/> Té: _____ ml <input type="checkbox"/> Cerveza: _____ ml <input type="checkbox"/> Alcohol: _____ ml <input type="checkbox"/> Vino tinto: _____ ml <input type="checkbox"/> Leche: _____ ml <input type="checkbox"/> Leche con sabor: _____ ml Marcas: <hr/> <hr/>
CENA Hora: <hr/> Lugar: <input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Fuera de casa	Platillo: _____ Ingredientes: <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> Marcas/restaurantes: <hr/> <hr/>	<hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>	<input type="checkbox"/> Vapor <input type="checkbox"/> Horno <input type="checkbox"/> A la plancha <input type="checkbox"/> Freído <input type="checkbox"/> Asado <input type="checkbox"/> Cocido <input type="checkbox"/> Guisado <input type="checkbox"/> Braseado <input type="checkbox"/> Otro: _____	<input type="checkbox"/> Agua: _____ ml <input type="checkbox"/> Refrescos: _____ ml <input type="checkbox"/> Jugos naturales: _____ ml <input type="checkbox"/> Jugos embotellados: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas en base de polvo: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas deportivas: _____ ml <input type="checkbox"/> Bebidas energizantes: _____ ml <input type="checkbox"/> Café: _____ ml <input type="checkbox"/> Té: _____ ml <input type="checkbox"/> Cerveza: _____ ml <input type="checkbox"/> Alcohol: _____ ml <input type="checkbox"/> Vino tinto: _____ ml <input type="checkbox"/> Leche: _____ ml <input type="checkbox"/> Leche con sabor: _____ ml Marcas: <hr/> <hr/>

ANEXO 3. CUESTIONARIO SEMI-CUANTITATIVO DE FRECUENCIA DE ALIMENTOS



Medición de Impacto

Fecha de la Encuesta

[]/[]/[]

TITULAR DEL HOGAR:

Número del integrante

CÓDIGO DE FAMILIA

AFM1

3.- Frecuencia Alimentaria

La frecuencia de consumo está organizada por grupos de alimentos y cada uno de ellos se describe por el tamaño de la porción en medida casera, por lo que usted deberá preguntar la frecuencia de consumo (día, semana o mes) y el número de porciones de cada alimento que se consume, por lo que el número de raciones debe registrarlo en la columna correspondiente; por ejemplo el primer alimento sería ¿Cuántas tazas de leche entera consume al día, semana o mes.

Lácteos y derivados	Nunca	día	sem	mes
1 Tz. Leche entera (240 ml.)				
1 Tz. Leche descremada o light (240 ml.)				
1 Tz. Leche semidescremada (240 ml.)				
1 C. Leche en polvo Liconsá				
1 Tz. Leche de sabor (240 ml.)				
1 Tz. Leche de soya (240 ml.)				
1 Tz. Yogurt (180 ml.)				
1 Pz. Danonino o similar				
1 Pz. Yakult o similares (chamytó, etc.)				
1 Ración Queso de vaca (40 g.)				
1 C. Requesón				
1 C. Queso Crema				

Frutos secos y oleaginosas	Nunca	día	sem	mes
1 ración Cacahuates, habas o pepitas (14 piezas ó 12 g.)				
1 ración de crema de cacahuete (2 cucharaditas)				
1 ración de nueces (7 mitades)				
1 ración de pistaches (18 piezas)				
1 ración de almendras (10 piezas)				
Frutos secos (ciruela, dátil, higo, pasas)				

Grasas	Nunca	día	sem	mes
1 C. Aceite vegetal				
1 Pz. Aguacate				
1 C. Manteca de puerco				
1 c. Margarina				
1 c. Mantequilla				
1 c. Mayonesa				
1 C. Crema				
1 C. Aderezo				

Cereales y tubérculos	Nunca	día	sem	mes
1 Tz. Arroz				
1 Tz. Espagueti				
1 Pz. Pan blanco de caja				
1 Pz. Bolillo (francés) o Margarita				
1 Pz. Pan integral de caja				
1 Pz. Pan dulce				
1 Pz. Galleta dulce				
1 Pz. Hot Cake				
1 Pz. Galleta salada				
1 Pz. Papa				
1 Tz. Cereal azucarado, de color o sabor				
1 Tz. Cereal alto en fibra (bran/avena)				
1 Tz. Cereal otros (corn flakes, arroz inflado, etc.)				
1 Pz. Tortilla de maíz				
1 Pz. Tortilla de harina de trigo				
1 C. Pozole				
1 Pz. Tamal				
1 Tz. Atole de maíz o Maicena				
1 Tz. Atole de Avena				
1 Pz. Barra de granola				
1 Pz. de tostada				
1 Pz. De galleta integral				
Elote (mazorca o grano)				

Leguminosas	Nunca	día	sem	mes
1 Tz. Frijol				
1 Tz. Lenteja, garbanzo, haba o alubia				
1 Tz. Soya				

Carnes, huevo y embutidos	Nunca	día	sem	mes
1 Ración Carne de puerco (40 g.)				
1 Ración Carne de res (30 g.)				
1 Ración Visceras de res 100 g. (hígado, lengua, molleja, riñones, pulmones)				
1 Ración Carne de res seca (11 g.)				
1 Ración Longaniza (45 g.)				
1 Ración Chorizo (15 g.)				
1 Pz. Salchicha de puerco				
1 Pz. Salchicha de pavo				
1 Rebanada Jamón de pavo				
1 Rebanada Jamón de puerco				
1 Rebanada Jamón de pavo y puerco				
1 Rebanada Mortadela				
1 Pz. Muslo de pollo				
1 Pz. Pierna de pollo				
1 Pz. Pechuga de pollo				
1 Pz. Alita de pollo				
1 Ración Visceras de pollo 100 g. (hígado, pescuezo, molleja, patas).				
1 Pz. Huevo				
1 Ración Carne de soya de res (30 g.)				
1 Ración Carne de soya de pollo (30 g.)				
1 Rebanada Pechuga de pavo				
1 Ración Chicharrón de puerco (12 g.)				
1 Ración Chicharrón prensado (12 g.)				

Bebidas	Nunca	día	sem	mes
1 Vaso Agua Natural (240 ml.)				
1 Lata Refresco Normal (355ml.)				
1 Lata Refresco Light (355 ml.)				
1 Tz. Café (240 ml.)				
1 Vaso Té envasado (Nestea, Arizona,)				
1 Tz. de Te o infusión (240ml) Manzanilla, canela, etc.				
1 Tz. Jugo natural sin azúcar adicionada (240 ml.)				
1 Tz. Jugo o néctar envasado con azúcar adicionada (240 ml.)				
1 Vaso Agua saborizada 240 ml. (Tang, Zuco, Kool aid)				
1 Vaso Agua saborizada sin calorías 240 ml. (Clight, Be-Light)				
1 Bote Bebidas deportivas (Gatorade 500 ml.)				
1 Lata Cerveza (356 ml.)				
1 Lata Cerveza sin alcohol (355 ml.)				
1 Copa Bebidas alcohólicas (Tequila, Whisky, Ron, etc.)				
Vino tinto				

ANEXO 4. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	MESES																		
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J
	N	E	A	B	A	U	U	G	E	C	O	I	N	E	A	B	A	U	U
	E	B	R	R	Y	N	L	O	P	T	V	C	E	B	R	R	Y	N	L
	2	2	2	2	2	2	2	2	T	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
									1										
FASE 01 - ASIGNACIÓN DE PROYECTO																			
Planteamiento de hipótesis, pregunta de investigación y objetivos.																			
Elaboración de marco teórico, planteamiento y justificación del problema.																			
Establecer y redactar metodología (tipo de estudio, reclutamiento de participantes, protocolo para toma y análisis de muestras)																			
FASE 02 - PROTOCOLO DE RECLUTAMIENTO																			
Elaboración de consentimiento informado, recordatorio de 24 horas y cuestionario semi-cuantitativa de frecuencia de alimentos																			
Esterilización de frascos de vidrio para toma de muestras																			
Protocolo de reclutamiento de muestras (consentimiento informado, toma de datos personales, recordatorio de 24 horas, cuestionario																			

semi-cuantitativa de frecuencia de alimentos, muestra de 15 ml en frascos de vidrio estériles)																				
FASE 03 -ANÁLISIS DE MUESTRA Y ELABORACIÓN DE BASE DE DATOS																				
Detección cuantitativa de AFM ₁ mediante ensayo competitivo ELISA																				
Elaboración de base de datos (datos personales, recordatorio de 24 horas, cuestionario semi-cuantitativa de frecuencia de alimentos, resultados)																				
FASE 04 -ANÁLISIS DE RESULTADOS																				
Análisis de resultados (Determinación de la exposición de AFM ₁ en población infantil, estimación del riesgo a AFM ₁ (Kuiper-Goodman, 1994 y relación de la ingesta dietética y presencia de AFM ₁ en leche materna																				
FASE 05 - TESIS																				
Elaboración y redacción de tesis																				
Defensa y presentación de tesis																				

ANEXO 5. RESUMEN CURRICULAR

L.C.N. Nallely Acosta Elias

Candidata para el grado de Maestra en Ciencias en Nutrición

Tesis: POSIBLE RIESGO CARCINOGENICO EN LACTANTES POR PRESENCIA DE AFLATOXINA M₁ EN LECHE MATERNA ASOCIADO AL CONSUMO DE ALIMENTOS DE SUS MADRES

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Nogales, Sonora el 29 de agosto de 1995, hija de la Sra. Graciela Elias Celaya y del Sr. Leonardo Acosta Fierros.

Educación: Egresada de la Licenciatura en Ciencias Nutricionales en la Universidad de Sonora campus Hermosillo. Estudios de Maestría en Ciencias en Nutrición en la Facultad de Salud Publica y Nutrición, UANL, durante el periodo agosto 2020 a junio 2022.

Experiencia Profesional: Profesor asiste en la Facultad de Salud Pública y Nutrición en la Universidad Autónoma de Nuevo León de enero a diciembre 2021 y docente titular en la Universidad Durango Santander de julio 2018 a agosto 2020. Nutrióloga en consultorio privado y empresa Weiser Lock. Ponencias sobre salud y alimentación en el sector privado y público (Weiser Lock, Samadhi Studio y CFE).

e-mail: nallelyacostae@gmail.com

Article

Levels of Aflatoxin M1 in Breast Milk of Lactating Mothers in Monterrey, Mexico: Exposure and Health Risk Assessment of Newborns

Rogelio Salas ^{1,*}, Nallely Acosta ¹, Aurora de Jesús Garza ², Alexandra Tijerina ¹, Roberto Dávila ², Zacarías Jiménez-Salas ¹, Laura Otero ¹, Mirna Santos ¹ and Antonio-José Trujillo ³

- ¹ Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP), Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey 64460, Mexico; nallely.acostae@uanl.edu.mx (N.A.); alexandra.tijerinas@uanl.mx (A.T.); zacarias.jimenezsl@uanl.edu.mx (Z.J.-S.); laura.otero@uanl.edu.mx (L.O.); mirna.santosl@uanl.mx (M.S.)
 - ² Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey 64460, Mexico; aurora.garzajr@uanl.edu.mx (A.d.J.G.); roberto.davilacnl@uanl.edu.mx (R.D.)
 - ³ Centre d'Innovació, Recerca i Transferència en Tecnologia dels Aliments (CIRTTA), TECNIO-UAB, XIA, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; toni.trujillo@uab.es
- * Correspondence: rogelio.salas@uanl.mx

Abstract: The present study aimed to determine the presence of the aflatoxin M1 (AFM1) in breast milk samples from 123 nursing women and the degree of exposure of infants to this toxin, in the metropolitan area of Monterrey, Nuevo Leon state (northeast Mexico). Upon analysis, 100% of the samples were found to be contaminated with the toxin at an average concentration of 17.04 ng/L, with a range of 5.00 to 66.23 ng/L. A total of 13.01% of the breast milk samples exceeded the regulatory limit of 25 ng/L for AFM1 concentration, set by the European Union. The estimated daily intake for AFM1 and the carcinogenic risk index were also determined in the 0- to 6-, 7- to 12-, 13- to 24-, and 25- to 36-month-old age groups. The AFM1 intake through breast milk ranged from 1.09 to 20.17 ng/kg weight/day, and was higher than the tolerable daily intake, indicating a carcinogenic risk for infants in the age groups of 0- to 24-months old. This evidence demonstrates a susceptibility of breast milk to AFM1 contamination that may suggest a carcinogenic risk for the breastfed infants in Monterrey city, Nuevo Leon state, and the need to control the presence of aflatoxins in foods eaten by nursing mothers.

Keywords: aflatoxin M1; breast milk; AFM1 daily intake; infant population; carcinogenic risk; Monterrey (Mexico)

Key Contribution: This is the first contribution realized in the northeast of Mexico, and the second nationally, to demonstrate a potential health risk associated with the aflatoxin M1 (AFM1) for infants through breast milk intake.



Citation: Salas, R.; Acosta, N.; Garza, A.d.J.; Tijerina, A.; Dávila, R.; Jiménez-Salas, Z.; Otero, L.; Santos, M.; Trujillo, A.-J. Levels of Aflatoxin M1 in Breast Milk of Lactating Mothers in Monterrey, Mexico: Exposure and Health Risk Assessment of Newborns. *Toxins* **2022**, *14*, 194. <https://doi.org/10.3390/toxins14030194>

Received: 8 February 2022

Accepted: 2 March 2022

Published: 5 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Breast milk is considered as the best food for neonates and infants [1], being a complex biofluid rich in nutrients (e.g., macronutrients, micronutrients, trace elements, etc.) and non-nutritive bioactive components (e.g., cells, immunoglobulins, cytokines, chemokines, hormones, growth factors, etc.) [2,3]. Breast milk contains a variety of bioactive compounds that contribute to proper brain, intestinal, and immune development [4]. The World Health Organization recommends exclusive breastfeeding for the first six months of life, continued until two years of life or longer [5].

Breast milk exhibits composition variability among individuals, and it is possible to find the presence of compounds that harm the health of the infant, such as aflatoxins [6]. Aflatoxins (AF) are considered toxic metabolites produced by some molds such as *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius* [7]. In humans, ingestion of the secondary metabolite AFB1 can lead to the accumulation and excretion of the aflatoxin M1 (AFM1) in breast milk through the ingestion of contaminated food sources, such as corn and derived products, nuts, dairy, sunflower oil, bread, and whole grain cereals [8,9].

AFM1 has been associated with carcinogenic, mutagenic, teratogenic, estrogenic, immunotoxic, nephrotoxic, and neurotoxic effects [8]. In addition, exposure to AFM1 in children has been associated with Reye's and Kwashiorkor's syndromes, immunosuppression, dermal irritation, endocrine disruptions, acute hepatitis, and others metabolic disturbances such as non-alcoholic liver disease [10–12]. Aflatoxin toxicity is related to intestinal barrier function [13,14]. It has been reported that when aflatoxin is present, there is a disruption of the intestinal barrier, which contributes to oxidative stress and DNA damage [14], and to an inflammatory response [13,14], causing a risk to health.

At present, there is limited scientific evidence on the presence of AFM1 in the breast milk of nursing mothers that have probably been exposed to diets containing AFB1 in Mexico, and the hazards of its presence. The aim of this study was to determine the occurrence and levels of AFM1 in breast milk, the exposure of infants to AFM1, and the potential carcinogenic risks associated with its consumption in the Monterrey population.

2. Results and Discussion

This is a first study to demonstrate the presence and concentration of AFM1 in breast milk from mothers in the northeast of Mexico, Nuevo Leon state. In terms of the presence of AFM1 in breast milk, the toxin was detected in 100% of the studied samples ($n = 123$), similar to the results reported from previous studies in other countries [15]. The presence of AFM1 in breast milk is directly related to the consumption habits of lactating mothers due to the pattern of foods they eat, which are different depending on the country. Diets composed of cereals, spices, seeds, oils and nuts, and cow-milk products can be contaminated with AFB1 and AFM1 to a greater or lesser extent depending on several environmental, storage, and climatic conditions that may affect AF production and the contamination of foods with AFB1 [16].

The current literature reports a highly variable occurrence and concentration of AFM1 in breast milk, with certain studies presenting high incidences (100%) such as Gambia and Tanzania [17], Iran [18], the Ecuadorian highlands [19], and Jordan [20], while medium or low occurrences have been reported in Portugal (33%), Ghana (22%), Italy and Cameroon (5%), and Brazil (4%) [21–24].

Table 1 shows the average, and minimum and maximum AFM1 concentrations found breast milk samples, according to the infant age group. The average concentration of AFM1 in breast milk samples was 17.04 ± 9.13 ng/L and ranged from 5.00 to 66.23 ng/L. Although the average AFM1 concentration in the analyzed breast milk samples did not exceed the tolerance limit of 25 ng/L set by the European Commission for infant formula [25], 13.01% of the individual samples exceeded this limit. On the other hand, it was observed that the breast milk samples collected from nursing mothers at different stages of lactation (age groups) showed similar AFM1 contents in the groups from 0 to 24 months-old, while the AFM1 content of breast milk in the group from 25 to 36 months-old had the lower mean level, although these differences were not significant.

The mean AFM1 levels detected in this study were among of those previously reported in other countries with moderate AFM1 concentrations, such as Turkey (32.83 ng/L), Nigeria (22.33 ng/L), Italy (12.98 ng/L), Brazil (12.01 ng/L) [26], Kuwait (9.7 ng/L) [27], Cyprus (7.84 ng/L) [28], Portugal (7.12 ng/L) [29], Iran (6.80 ng/L) [30], Gambia (5.65 ng/L), Colombia (5.20 ng/L) [31], and Lebanon (4.31 ng/L) [32], but far from the high concentration levels reported by different studies in the United Arab Emirates (210–4060 ng/L) [33], Egypt (7100 ng/L) [34], Sudan (401 ng/L) [35], and Serbia (370 ng/L) [36]. In a study from

central Mexico, 89% of breast milk samples ($n = 112$) showed the presence of AFM1 at a concentration of 10.35 ng/L (range of 3.01–34.24 ng/L), and 7% of samples exceeded the recommended limit of 25 ng/L [9].

Table 1. Aflatoxin M1 (AFM1) presence in breast milk.

Age Group (Months)	n (%) *	AFM1 (ng/L)	
		Mean \pm SD	Min–Max
0 to 6	86 (9.30)	16.68 \pm 9.66	5.00–66.23
7 to 12	18 (22.22)	17.92 \pm 8.45	5.00–38.26
13 to 24	16 (25.00)	18.96 \pm 7.49	5.00–29.21
25 to 36	3 (00.00)	11.96 \pm 3.46	8.16–14.93
Total	123 (13.01)	17.04 \pm 9.13	5.00–66.23

* n is the number of samples of breast milk collected for each age group. The value in parentheses indicates the samples' percentage above the limit set by the European Union (25 ng/L) with respect to the total.

Table 2 shows the estimated daily intake (EDI; means, and minimum and maximum) of AFM1 through breast milk, and the potential carcinogenic risk index (CRI) according to the equation proposed by Kuiper–Goodman (1994) [37]. Considering the mean AFM1 levels, body weight, and milk intakes of each age group of infants, the EDI values ranged from 1.81 to 5.08 ng/kg weight/day. The youngest group, from 0- to 6-months old, had the highest AFM1 EDI values, showing the susceptibility of this group of infants; EDI values slightly diminished in the subsequent age groups, with the infant group of 25- to 36-months old having the lowest exposure, due to a higher body weight and a lower consumption of breast milk.

Table 2. Estimated daily intake (EDI) of aflatoxin M1 and the carcinogenic risk index (CRI) according to infant age group.

Age Group (Months)	Body Weight (kg)	Milk Intake (L/day)	EDI (ng/kg Weight/Day)		CRI * (2 ng/kg Weight/Day)
			Mean	Min–Max	
0 to 6	6.50	1.98	5.08 \pm 2.94	1.52–20.18	Risk
7 to 12	8.99	2.35	4.68 \pm 2.21	1.31–9.98	Risk
13 to 24	10.93	2.37	4.10 \pm 1.62	1.08–6.33	Risk
25 to 36	13.24	2.02	1.81 \pm 0.52	1.25–2.28	Potential risk

* CRI: carcinogenic risk index, as reported by Kuiper–Goodman (1994) and Quevedo-Garza et al. (2020) [37,38].

In the group aged 0- to 6-months old, infants were exclusively breastfed. However, as infant age increased, there was an introduction of complementary foods such as solid foods, infant formula, liquid milk, or dairy products that may contribute to AFM1 intake. To understand the impact of this, studies carried out in Nuevo Leon, Mexico (northeast region), analyzed several commercial follow-on infant formula and liquid milks (national origin), reporting AFM1 mean concentrations of 180 ng/L (range: 0–450 ng/L) and 520 ng/L (range: 100–1270 ng/L) for these dairy products, respectively [39,40], showing its relevance as a health risk when an infant diet is supplemented with these dairy products.

Limited studies exist estimating the daily intake of AFM1 in infants during the lactation period. The results obtained in this study are close to the EDI values found in Central Mexico (0.92–6.28 ng/kg weight/day) [38] and higher than those found in Lebanon (0.65–0.80 ng/kg weight/day) [33] or Morocco (0.35 ng/kg weight/day) [39], but lower than those recorded in Egypt (52.68 ng/kg weight/day) [41] or Tanzania (11.08 ng/kg weight/day) [42].

The AFM1 intake was higher than the CRI of 2 ng/kg weight/day in infants aged 0- to 24-months old, indicating a high risk of AFM1 exposure for the infant population of northeast Mexico.

These study results reflect the possible mother-to-infant contamination occurring through breast milk, thus increasing the risk by exposing the infants to AFM1 and possibly to other diverse carcinogenic toxins; therefore, it is imperative to establish health regulations to guarantee the quality and safety of food products that may be contaminated by aflatoxins.

3. Conclusions

Breast milk samples analyzed from lactating mothers in Monterrey, Nuevo Leon, Mexico, have shown a high occurrence of AFM1 (100% of the samples) with different levels from 5.00 to 66.23 ng/L, in 123 breast milk samples, with 13.01% of samples showing AFM1 levels higher than the upper limits (25 ng/L) established by the EU. Based on the average infant's body weight and average breast milk intake, the daily AFM1 intake and carcinogenic risk index were estimated in infants aged from 0- to 36-months old, with infants aged from 0- to 24-months old determined to be at risk. These data indicate that lactating mothers in northeast Mexico have a high exposure to AFB1 and/or AFM1 through diet. This evidence strongly supports the need to establish public health programs to give nutrition education to women before and during breastfeeding periods, such that nursing women understand the importance of selecting food choices that lower susceptibility to AFM1 contamination and minimize its passage into breast milk.

4. Materials and Methods

4.1. Breast Milk Samples

Breast milk samples ($n = 123$) were obtained from breastfeeding women at regular medical visits to local health centers from the metropolitan area of Monterrey city, Nuevo Leon state (northeast region of Mexico), during the summer of 2021. Breast milk samples were collected under hygienic conditions in sterile glass bottles, protected from light, and stored until use at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Before analysis, breast milk samples were thawed overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, and samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The upper fatty layer was discarded and 100 μL from each defatted milk sample was used in ELISA assay. All the procedures followed in this study were executed according to the NOM-087-ECOL-SSA1-2002, which establishes the classification of hazardous biological-infectious waste and the specifications of its management [43].

4.2. Quantitative AFM1 Determination by ELISA Assay

AFM1 was detected via an ELISA assay, using the RIDASCREEN[®] kit Aflatoxin M1 (Art. No.: R1121, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) based on antigen-antibody reactions, as Quevedo-Garza et al. (2018) has described. A 6-point calibration curve was performed in triplicate, with concentrations ranging from 0 to 80 ng/L (0, 5, 10, 20, 40, and 80 ng/L), using certified AFM1 standards. According to the manufacturer's description, the limit of detection was 5 ng/kg. The resulting data were processed and calculated with the software RIDASOFT[®]Win.NET (v1.96) and reported as nanograms per liter (ng/L).

4.3. Estimation of AFM1 Exposure in Infants

To determine the exposure of the infant population to AFM1, the estimated daily intake (EDI) of AFM1 was calculated according to the equation proposed by Quevedo-Garza et al. (2020). Infants were grouped according to their age: 0- to 6-months old, 7- to 12-months old, 13- to 24-months old and 25- to 36-months old. The average breast milk intake and average body weight were obtained from data corresponding to the state of Nuevo León from the National Health and Nutrition Survey (ENSANUT) reported in 2018 [44].

According to the infants' age groups, milk intake was multiplied by the AFM1 concentration in breast milk, and then divided by infants' body weight, as stated in the following formula:

$$\text{Estimated AFM1 daily intake (ng/kg weight/day)} = \frac{[\text{AFM1 (}\frac{\text{ng}}{\text{L}}\text{)}] \times [\text{Milk intake (L)}]}{\text{Body weight (kg)}}$$

where AFM1 is the average of AFM1 concentration in the analyzed samples, expressed in nanograms per liter (ng/L); milk intake is the average daily breast milk intake by the infant population, expressed in liters (L); and body weight is the average body weight of the infants from each age group, expressed in kilograms (kg).

4.4. Carcinogenic Risk Index

A carcinogenic risk index (CRI) was established for the infants consuming AFM1 through breast milk by comparing the levels of estimated AFM1 daily intake (EDI) vs. the tolerable daily intake (TDI) of 2 ng/kg weight/day, as previously reported by Kuiper-Goodman (1994) and Quevedo-Garza et al. (2020).

4.5. Statistical Analysis

All samples were analyzed in duplicate and the AFM1 concentrations in breast milk were expressed as mean \pm standard deviation (SD), with minimum and maximum values. In order to evaluate the AFM1 concentrations within the different age-groups, one-way ANOVA was performed using the SPSS[®] v17.0 package to a 95% level of significance, and Tukey adjustment was performed ($p < 0.05$).

Author Contributions: Methodology, R.S. and N.A.; data curation, A.d.J.G.; software, L.O.; formal analysis, A.d.J.G. and Z.J.-S.; writing—review and editing, R.S., A.T. and A.-J.T.; supervision, R.D. and M.S.; project administration, R.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financed by the Support Program for Scientific and Technological Research-UANL (PAICYT), with the code number: SA1962-21. The determination of aflatoxins by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out in the research laboratories of the Department of Biochemistry and Molecular Medicine of the Faculty of Medicine of the Autonomous University of Nuevo León, Mexico.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of FASPYN (21-FaSPyN-SA-08; Date: 06/10/2021).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Olimpia Aguilar Hernández, Fernando Hernández Flores, and Marla Lucia González Mendez for the collection of milk samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mosca, F.; Gianni, M.L. Human milk: Composition and health benefits. *Pediatr. Med. E Chir.* **2017**, *39*, 155. [CrossRef] [PubMed]
2. Lawrence, R.M.; Lawrence, R.A. Biochemistry of human milk. In *Breastfeeding*, 8th ed.; Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2016; ISBN 978-0-323-35776-0.
3. Samuel, T.; Zhou, Q.; Giuffrida, F.; Munblit, D.; Verhasselt, V.; Thakkar, S. Nutritional and non-nutritional composition of human milk is modulated by maternal, infant, and methodological factors. *Front. Nutr.* **2020**, *7*, 576133. [CrossRef] [PubMed]
4. Tauber, K.A. Human Milk and Lactation: Background, Physiology, Human Milk and Preterm Infant. Available online: <https://emedicine.medscape.com/article/1835675-print> (accessed on 20 December 2021).
5. World Health Organization. La Lactancia Materna Exclusiva Durante los Primeros 6 Meses es lo Mejor para Todos los Niños. Available online: https://apps.who.int/mediacentre/news/statements/2011/breastfeeding_20110115/es/index.html (accessed on 20 December 2021).
6. Yalçın, S.S.; Günes, B.; Yalçın, S. Influence of season and lactational stage on aflatoxin M1 and ochratoxin-A in human milk in a cohort study from southeastern region of Turkey. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**. [CrossRef]
7. Ismail, A.; Gonçalves, B.; de Neeff, D.V.; Ponzilacqua, B.; Coppa, C.; Hintzsche, H.; Sajid, M.; Cruz, A.G.; Corassin, C.H.; Oliveira, C. Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. *Food Res. Int.* **2018**, *113*, 74–85. [CrossRef]
8. Martínez, H.Y.; Hernández, S.; Reyes, C.; Vázquez, G. El género aspergillus y sus micotoxinas en maíz en México: Problemática y perspectivas. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2013**, *31*, 126–147.

9. Cantú, F.; Aguilar, J.E.; de Leon, C.I.; Esparza, J.; Vallejo, B.; Gonzalez, A.F.; García, H.S.; Hernández, A. Occurrence and factors associated with the presence of aflatoxin M1 in breast milk samples of nursing mothers in central Mexico. *Food Control* **2016**, *62*, 16–22. [CrossRef]
10. Gong, Y.; Hounsa, A.; Egal, S.; Turner, P.C.; Sutcliffe, A.E.; Hall, A.J.; Cardwell, K.; Wild, C.P. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: A longitudinal study in Benin, West Africa. *Environ. Health Perspect.* **2004**, *112*, 1334–1338. [CrossRef]
11. Urrego, J.R.; Díaz, G.J. Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Rev. Fac. Med.* **2006**, *54*, 108–116.
12. Wild, C.P.; Montesano, R. A model of interaction: Aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. *Cancer Lett.* **2009**, *286*, 22–28. [CrossRef]
13. Gao, Y.; Bao, X.; Meng, L.; Liu, H.; Wang, J.; Zheng, N. Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induce compromised intestinal integrity through clathrin-mediated endocytosis. *Toxins* **2021**, *13*, 184. [CrossRef]
14. Yang, H.; Wang, Y.; Yu, C.; Jiao, Y.; Zhang, R.; Jin, S.; Feng, X. Dietary resveratrol alleviates AFB1-induced ileum damage in ducks via the Nrf2 and NF- κ B/NLRP3 signaling pathways and CYP1A1/2 expressions. *Agriculture* **2022**, *12*, 54. [CrossRef]
15. Hernández, M.; Juan, A.; Moltó, J.C.; Mañes, J.; Juan, C. Evaluation of mycotoxins in infant breast milk and infant food, reviewing the literature data. *Toxins* **2021**, *13*, 535. [CrossRef] [PubMed]
16. Mahato, D.K.; Lee, K.E.; Kamle, M.; Devi, S.; Dewangan, K.N.; Kumar, P.; Kang, S.G. Aflatoxins in Food and Feed: An Overview on Prevalence, Detection and Control Strategies. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2266. [CrossRef] [PubMed]
17. Zinedine, A.; Salah, J.B.; Abbès, S.; Tantaoui, A. Aflatoxin M1 in Africa: Exposure assessment, regulations, and prevention strategies—A Review. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2021**, *258*, 73–108. [CrossRef] [PubMed]
18. Azarikia, M.; Mahdavi, R.; Nikniaz, L. Occurrence and dietary factors associated with the presence of aflatoxin B 1 and M 1 in breast milk of nursing mothers in Iran. *Food Control* **2017**, *86*, 207–213. [CrossRef]
19. Ortiz, J.; Jacxsens, L.; Astudillo, G.; Ballesteros, A.; Donoso, S.; Huybregts, L.; De Meulenaer, B. Multiple mycotoxin exposure of infants and young children via breastfeeding and complementary/weaning foods consumption in Ecuadorian highlands. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *118*, 541–548. [CrossRef] [PubMed]
20. Omar, S.S. Incidence of aflatoxin M1 in human and animal milk in Jordan. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2012**, *75*, 1404–1409. [CrossRef] [PubMed]
21. Bogalho, F.; Duarte, S.; Cardoso, M.; Almeida, A.; Cabeças, R.; Lino, C.; Pena, A. Exposure assessment of portuguese infants to aflatoxin M1 in breast milk and maternal social-demographical and food consumption determinants. *Food Control* **2018**, *90*, 140–145. [CrossRef]
22. Galvano, F.; Pietri, A.; Bertuzzi, T.; Gagliardi, L.; Ciotti, S.; Luisi, S.; Bognanno, M.; La Fauci, L.; Iacopino, A.M.; Nigro, F.; et al. Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 496–501. [CrossRef] [PubMed]
23. Tchana, A.N.; Moundipa, P.F.; Tchouanguép, F.M. Aflatoxin contamination in food and body fluids in relation to malnutrition and cancer status in Cameroon. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, *7*, 78–88. [CrossRef] [PubMed]
24. Ishikawa, A.T.; Takabayashi, C.R.; Ono, E.Y.; Bagatin, A.K.; Rigobello, F.F.; Kawamura, O.; Hirooka, E.Y.; Itano, E.N. Exposure assessment of infants to aflatoxin M1 through consumption of breast milk and infant powdered milk in Brazil. *Toxins* **2016**, *8*, 246. [CrossRef] [PubMed]
25. Schrenk, D.; Bignami, M.; Bodin, L.; Chipman, J.K.; del Mazo, J.; Grasl-Kraupp, B.; Hogstrand, C.; Hoogenboom, L.R.; Leblanc, J.-C.; EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain; et al. Scientific opinion—Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA J.* **2020**, *18*, 6040. [CrossRef]
26. Fakhri, Y.; Rahmani, J.; Oliveira, C.; Franco, L.T.; Corassin, C.H.; Saba, S.; Rafique, J.; Khaneghah, A.M. Aflatoxin M1 in human breast milk: A global systematic review, meta-analysis, and risk assessment study (Monte Carlo simulation). *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *88*, 333–342. [CrossRef]
27. Dashti, B.; Al-Hamli, S.; Alomirah, H.; Al-Zenki, S.; Abbas, A.B.; Sawaya, W. Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control* **2009**, *20*, 686–690. [CrossRef]
28. Kunter, I.; Hürer, N.; Gülcan, H.O.; Öztürk, B.; Doğan, İ.; Şahin, G. Assessment of aflatoxin M1 and heavy metal levels in mothers breast milk in Famagusta, Cyprus. *Biol. Trace Elem. Res.* **2017**, *175*, 42–49. [CrossRef] [PubMed]
29. Bogalho, F. Exposure assessment of infants to Aflatoxin M1 in Breast milk and maternal social-demographical and food consumption determinants. Master Thesis, Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra, Portugal, 2017. Available online: <http://hdl.handle.net/10400.26/18655> (accessed on 24 January 2022).
30. Jafarian, A.; Pourradi, N. Aflatoxin M1 contamination of human breast milk in Isfahan, Iran. *Adv. Biomed. Res.* **2013**, *2*, 86. [CrossRef]
31. Diaz, G.J.; Sánchez, M.P. Determination of aflatoxin M1 in breast milk as a biomarker of maternal and infant exposure in Colombia. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **2015**, *32*, 1192–1198. [CrossRef] [PubMed]
32. Elaridi, J.; Bassil, M.; Kharm, J.A.; Daou, F.; Hassan, H.F. Analysis of aflatoxin M1 in breast milk and its association with nutritional and socioeconomic status of lactating mothers in Lebanon. *J. Food Prot.* **2017**, *80*, 1737–1741. [CrossRef] [PubMed]
33. Abdulrazzaq, Y.M.; Osman, N.; Ibrahim, A. Fetal exposure to aflatoxins in United Arab Emirates. *Ann. Trop. Paediatr.* **2003**, *22*, 3–9. [CrossRef] [PubMed]

34. Tomerak, R.H.; Shaban, H.H.; Khalafallah, O.A.; El Shazly, M.N. Assessment of exposure of Egyptian infants to aflatoxin M1 through breast milk. *J. Egypt Public Health Assoc.* **2011**, *86*, 51–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Elzupir, A.O.; Abas, A.R.; Fadul, M.H.; Modwi, A.K.; Ali, N.M.; Jadian, A.F.; Ahmed, N.A.; Adam, S.Y.; Ahmed, N.A.; Khairy, A.A.; et al. Aflatoxin M₁ in breast milk of nursing Sudanese mothers. *Mycotoxin Res.* **2012**, *28*, 131–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Radonić, J.R.; Tanackov, S.D.; Mihajlović, I.J.; Grujić, Z.S.; Miloradov, M.B.; Škrinjar, M.M.; Sekulić, M.M. Occurrence of aflatoxin M1 in human milk samples in Vojvodina, Serbia: Estimation of average daily intake by babies. *J. Environ. Sci. Health B* **2017**, *52*, 59–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kuiper-Goodman, T. Prevention of human mycotoxicoses through risk assessment and risk management. In *Mycotoxins in Grain, Compounds other than Aflatoxin*; Miller, J.D., Trenholm, H.L., Eds.; Eagan Press: St. Paul, MN, USA, 1994; pp. 439–469.
38. Quevedo, P.A.; Amador, G.G.; Salas, R.; Ramos, E.G.; Trujillo, A.J. Aflatoxin M1 determination in infant formulae distributed in Monterrey, Mexico. *Toxins* **2020**, *12*, 100. [[CrossRef](#)]
39. Cherkani, A.; Ghanname, I.; Zinedine, A.; Sefrioui, H.; Qmichou, Z.; Mouane, N. Aflatoxin M1 prevalence in breast milk in Morocco: Associated factors and health risk assessment of newborns “CONTAMILK study”. *Toxicon* **2020**, *187*, 203–208. [[CrossRef](#)]
40. Quevedo, P.A.; Amador, G.G.; Cantú, P.C.; Trujillo, J.A. Aflatoxin M1 occurrence in fluid milk commercialized in Monterrey, Mexico. *J. Food Saf.* **2018**, *38*, e12507. [[CrossRef](#)]
41. El-Tras, W.F.; El-Kady, N.N.; Tayel, A.A. Infants exposure to aflatoxin M₁ as a novel foodborne zoonosis. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 2816–2819. [[CrossRef](#)]
42. Magoha, H.; Kimanya, M.; De Meulenaer, B.; Roberfroid, D.; Lachat, C.; Kolsteren, P. Association between aflatoxin M1 exposure through breast milk and growth impairment in infants from Northern Tanzania. *World Mycotoxin J.* **2014**, *7*, 277–284. [[CrossRef](#)]
43. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección—Salud Ambiental—Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos—Clasificación y Especificaciones de Manejo, Last Revised January 2003. Available online: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=704675&fecha=17/02/2003#:~:;text=NORMA%20Oficial%20Mexicana%20NOM%2D087,Medio%20Ambiente%20y%20Recursos%20Naturales (accessed on 24 January 2022).
44. González, L.D.; Unar, M.; Quezada, A.D.; Bonvecchio, A.; Rivera, J. Situación de las prácticas de lactancia materna y alimentación complementaria en México: Resultados de la Ensanut 2018–2019. *Salud Publica Mex.* **2020**, *62*, 704–713. [[CrossRef](#)]