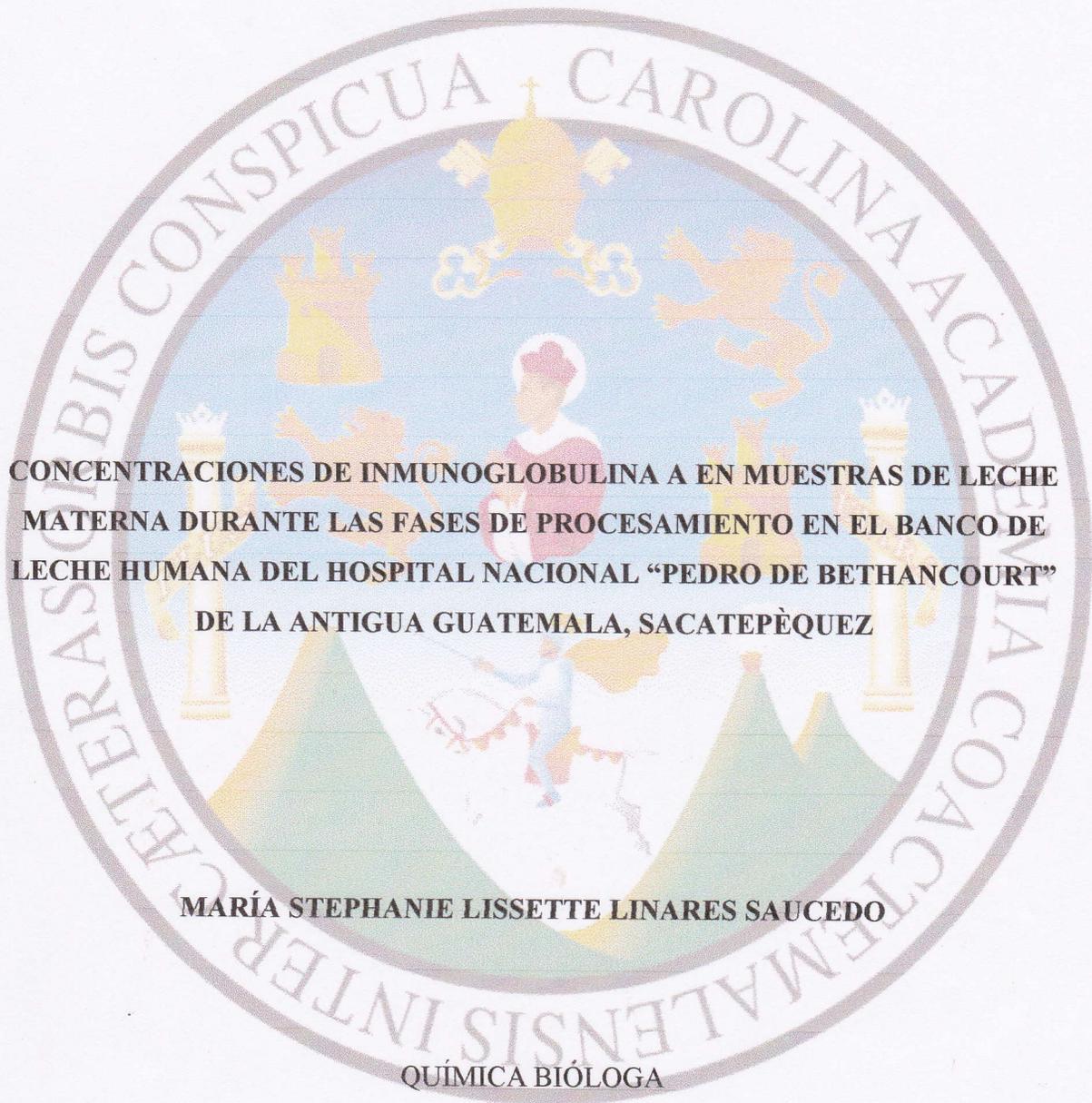


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



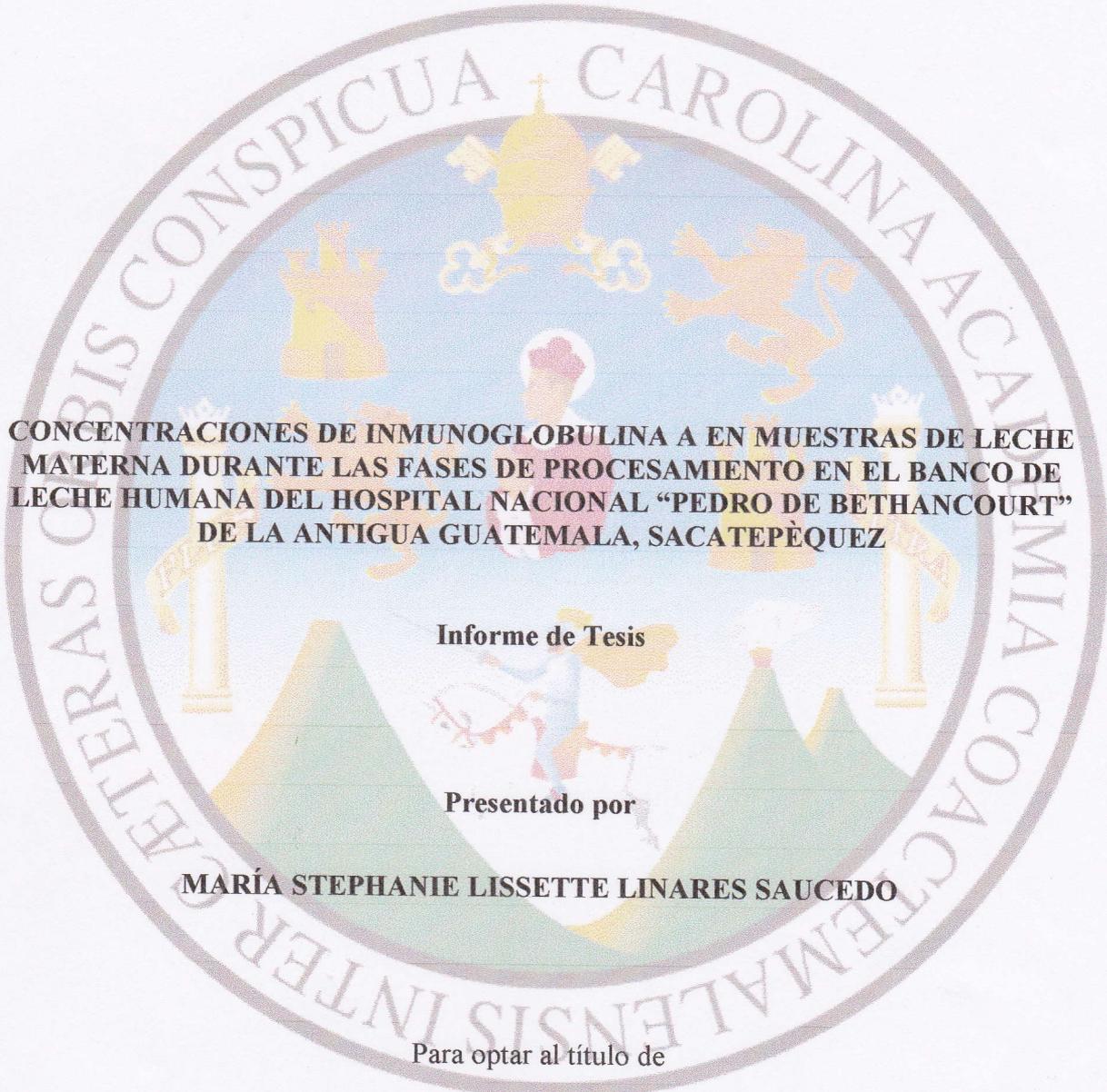
**CONCENTRACIONES DE INMUNOGLOBULINA A EN MUESTRAS DE LECHE  
MATERNA DURANTE LAS FASES DE PROCESAMIENTO EN EL BANCO DE  
LECHE HUMANA DEL HOSPITAL NACIONAL "PEDRO DE BETHANCOURT"  
DE LA ANTIGUA GUATEMALA, SACATEPÈQUEZ**

**MARÍA STEPHANIE LISSETTE LINARES SAUCEDO**

**QUÍMICA BIÓLOGA**

**GUATEMALA, OCTUBRE DE 2013**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large circular emblem. It features a central figure of a woman in a blue dress, likely the Virgin Mary, holding a child. Above her is a golden crown and a shield with a cross. The shield is supported by two golden columns. The background of the seal is light blue and green. The text "UNIVERSITAS CAROLINA ACADÉMICA COACTEMALENSIS INTER CÆTERAS OBIS CONSPICUA" is written around the perimeter of the seal.

**CONCENTRACIONES DE INMUNOGLOBULINA A EN MUESTRAS DE LECHE  
MATERNA DURANTE LAS FASES DE PROCESAMIENTO EN EL BANCO DE  
LECHE HUMANA DEL HOSPITAL NACIONAL "PEDRO DE BETHANCOURT"  
DE LA ANTIGUA GUATEMALA, SACATEPÈQUEZ**

**Informe de Tesis**

**Presentado por**

**MARÍA STEPHANIE LISSETTE LINARES SAUCEDO**

Para optar al título de

**QUÍMICA BIÓLOGA**

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2013

## **JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva, Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Frayver Manuel de León Mayorga	Vocal IV
Br. Maily Graciela Córdova Audón	Vocal V

## ACTO QUE DEDICO

**A Dios y María Auxiliadora:** Por ser mi guía y mi fortaleza, que nunca me abandonaron en momentos de adversidad.

**A mis Padres:** Héctor Ráciel Linares Pérez por sus consejos y a mi madre Norma Lissette Saucedo Melgar por amarme tanto apoyándome en mis luchas constantes por llegar a alcanzar las metas trazadas, mi maestra, amiga... no existen palabras que puedan expresar mi agradecimiento hacia ti, TE AMO MAMITA

**A mi Hermano:** Dr. Héctor Alejandro Linares Saucedo, gracias hermanito, por apoyarme siempre y darme tu cariño incondicional.

**A mi Abuelita:** Delia Amanda Melgar de Saucedo, por darme su amor, porque se que siempre estoy en tus oraciones.

**A mis Tíos:** Melvin, Jacky, Lyliana, Eddy, Willy, Jimmy, Ivan, Fausto, y demás familia gracias por su cariño

## AGRADECIMIENTOS

**A la Gloriosa Tricentaria Universidad de San Carlos de Guatemala:** Centro de estudios donde realicé mis sueños hasta culminar el grado académico que hoy ostento como profesional especialmente a la Escuela de Química Biológica

**A mi Asesor:** Lic Gerardo Arroyo por su apoyo, amistad y colaboración.

**Lic Federico Nave:** Por su apoyo incondicional en la elaboración del presente trabajo de investigación.

**Banco de Leche del Hospital Nacional “Pedro de Bethancourt”:** por haber permitido realizar mi investigación en esta institución y por el apoyo brindado.

**Licda Renata Moreira:** por su colaboración en mi trabajo de tesis.

**A mis Revisoras:** Licda. Margarita de Paz y Blanca Samayoa por su revisión y asesoramiento.

## ÍNDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
III.	Antecedentes	
A.	Leche materna	4
B.	Inmunoglobulina A	5
C.	Ensayos de determinación de IgA	9
D.	Bancos de leche humana	13
E.	Procesamiento en los bancos de leche	17
F.	Leche materna pasteurizada	20
IV.	Justificación	22
V.	Objetivos	23
VI.	Hipótesis	24
VII.	Materiales y Métodos	25
VIII.	Resultados	32
IX.	Discusión de Resultados	38
X.	Conclusiones	43
XI.	Recomendaciones	44
XII.	Referencias	45
XIII.	Anexos	50

## I. Resumen

La inmunoglobulina A es una de las inmunoglobulinas que se encuentra en la leche materna, su principal función es fortalecer el sistema inmunológico del neonato frente a diversas infecciones causadas por bacterias y virus.

Los principales objetivos del presente estudio fueron establecer las concentraciones de IgA de la leche materna durante las fases a las que se somete en un banco de leche, determinar la concentración de IgA de leche pasteurizada antes de su administración al neonato e identificar la etapa del proceso que afecta las concentraciones de IgA.

Se estudiaron 20 muestras de leche materna en distintas fases del proceso al que son sometidas en el banco de leche humana del Hospital Nacional "Pedro de Bethancourt" de la Antigua Guatemala. Estas cuatro fases son: a) extracción, b) descongelación I, c) pasteurización y d) descongelación II. La evaluación de los procedimientos, consistió en medir las concentraciones de inmunoglobulina A total, mediante el método de inmunturbidimetría. El principio de la prueba se basa en la detección de anticuerpos de cabra anti-IgA formando compuestos insolubles con el suero de la muestra, que con la intensidad que presentan son medidos en turbidez. Los resultados fueron analizados a través de la prueba de Fisher de la mínima diferencia significativa para la comparación de las fases del proceso con la concentración de IgA inicial presente en cada una de las muestras, todas a un nivel de significancia del 0.05 ( $\alpha= 0.05$ ).

Los resultados obtenidos describen que en las fases en que existe reducción de la concentración de IgA son; descongelación I donde se encuentra el 80.4%, pasteurización 63.6% y en descongelación II el 48.5% de concentración de IgA. Se concluye que las muestras presentaron mayor reducción de concentración de IgA en la fase de descongelación I, en donde se destruye el 20% de proteína, debido a que en esta fase las temperaturas no son controladas formando cristales que rompen la proteína y por ende reducen su concentración en las muestras, por lo que se recomienda la utilización de métodos de enfriamiento rápido que involucren una mejor congelación y control de

temperaturas para disminuir los casos en que la inmunoglobulina es destruida y así brindar leche pasteurizada con mayores contenidos de IgA al neonato.

## II. Introducción

El neonato posee un sistema inmunológico inmaduro, por lo que es susceptible a la incidencia y gravedad de infecciones, especialmente si es prematuro o de bajo peso al nacer (Díaz, 2008).

La leche materna ha sido considerada el alimento ideal para el neonato que por su contenido en nutrientes le ayudan en su crecimiento y desarrollo, adecuándose a sus necesidades y brindándole anticuerpos naturales tales como la inmunoglobulina A (IgA), que le ayuda a fortalecer su sistema inmunológico al protegerlo frente a infecciones causadas por bacterias y virus habituales (Moreira, 2011).

Los bancos de leche humana promueven la lactancia materna, ofreciendo una alternativa para aquellos niños que no pueden alimentarse de la leche de su propia madre, apoyando su recolección, procesamiento y distribución de la leche materna extraída (Gil, 2010).

Instituciones como el banco de leche humana del Hospital Nacional “Pedro de Bethancourt” de la Antigua Guatemala, es un centro especializado en el procesamiento de la leche y promotor de lactancia materna, que somete la leche humana a varios procesos en los que las concentraciones de proteínas, como IgA sufren variaciones (Rojas & Guerrero, 1999).

Por lo anterior se considera importante realizar el presente estudio, que pretende evaluar las concentraciones promedio de IgA al finalizar cada una de las etapas del procesamiento de la leche materna en el banco de leche: extracción, primera descongelación, pasteurización y segunda descongelación, previamente a la toma del neonato. Los datos obtenidos permitirán conocer el aporte inmunológico que brinda la leche humana procedente de los bancos en los neonatos, como alternativa a la lactancia materna.

### **III. Antecedentes**

#### **A. Leche materna**

La leche materna es un fluido biológico que se forma de la propia glándula mamaria, aporta energía y nutrientes esenciales utilizando componentes tales como carbohidratos, minerales, proteínas, hormonas, vitaminas, entre otros. Es el primer alimento natural y adecuado para el desarrollo y crecimiento del lactante durante sus primeros meses hasta el segundo año de vida.

Es un sistema complejo que posee más de 250 constituyentes, entre los que se pueden mencionar: proteínas, lípidos, citosinas, electrolitos, antimicrobianos, enzimas, antiinflamatorios, inmunomoduladores y microelementos (Wilson, 2006).

La leche materna posee gran cantidad de proteínas séricas, como la alfa-lactoalbúmina, lactoferrina, lisozima e inmunoglobulinas, especialmente inmunoglobulina A (Amanzo, 2010) (Ibáñez, 2008).

Respecto a las inmunoglobulinas, estas se encuentran todas especialmente en el calostro. La leche materna contiene predominantemente inmunoglobulina A (IgA) y otras inmunoglobulinas aunque en menor proporción tales como IgM, IgG, IgD e IgE las cuales presentan diversas funciones biológicas y que ayudan en el fortalecimiento del sistema inmunológico del lactante, protegiéndolo contra microorganismos que pueden causarle enfermedades, ya que poseen actividad contra virus, protozoos, bacterias, antiglobulinas, alergias y fundamentalmente brindándole una protección en el tubo digestivo del recién nacido. La inmunoglobulina M de la leche, es de baja afinidad pero presenta gran avidéz por antígenos multivalentes especialmente bacterianos. La IgA es de gran importancia al impedir el ingreso de microorganismos y macromoléculas al organismo, y ayuda a proteger el sistema gastrointestinal del lactante de microorganismos que entran por la mucosa intestinal (Díaz, 2008) (García, 2008).

La inmunoglobulina que se encuentra en muy bajas concentraciones es la IgE, en niños alimentados con leche materna, les confiere una protección inmunológica contra parásitos, al intervenir en la respuesta inmune contra estos, especialmente helmintos. Por otro lado la IgG, defiende al organismo de muchos patógenos que podrían ser transportados en la sangre como bacterias, virus, algunos hongos y toxinas. Se encuentra en elevados niveles en el calostro, pero desciende en los primeros días de amamantamiento (Fustiñana, 2009) (Díaz, 2003).

## **B. Inmunoglobulina A**

La IgA es la inmunoglobulina más heterogénea y tiene forma de T a diferencia de las restantes inmunoglobulinas con forma de Y, tiene una masa molecular que oscila entre 170.000 y 720.000 mg, ya que forma estructuras poliméricas de la unidad estructural básica; la cadena H es del isótopo  $\alpha$ , contiene un 7-12% en peso de glúcidos y su concentración en el suero es de 90-420 mg por 100 mL (Fustiñana, 2009).

Existen dos subclases de IgA: IgA1 e IgA2, que difieren por la ausencia de una secuencia de 13 aminoácidos en la región en bisagra de la IgA2. Esta diferencia estructural explica la resistencia de la IgA2 a las proteasas bacterianas y explica por qué este subtipo es más frecuente en las mucosas.

La inmunoglobulina A es sintetizada en grandes cantidades por acúmulos linfoides y placas de peyer, y se encuentra principalmente en las secreciones mucosas tales como; saliva, lágrimas, calostro, leche, fluidos gastrointestinales, secreción nasal y bronquial y orina (Hanson, 1999) (Wilson, 2006).

### **1. Función:**

La función esencial de las inmunoglobulinas es la de unirse al antígeno, de esta manera actúan como receptoras de señales antigénicas o bien pueden colaborar en la destrucción de los mismos cuando dichas inmunoglobulinas se encuentran de forma soluble.

Los anticuerpos IgA, actúan como la defensa inicial contra los patógenos invasores tales como virus y bacterias, identifican los antígenos patógenos e impiden que se instalen en las mucosas (Fustiñana, 2009).

Las mucosas del organismo permanecen en contacto con múltiples agentes infecciosos. La IgA interviene en forma crucial en la inmunidad innata al evitar la penetración de microorganismos y de proteínas extrañas en la mucosa. También neutraliza toxinas y organismos infecciosos. La incapacidad de la IgA de activar el complemento o de actuar como una opsonina es una ventaja en las secreciones a cuyo nivel el inicio de una respuesta inflamatoria podría comprometer el sistema de defensa local y la integridad de las mucosas.

Además la inmunoglobulina A es esencial en la regulación de la respuesta inmunológica, posee actividad antiinflamatoria y es capaz de inhibir ciertas funciones como fagocitosis inducida por IgG, actividad bactericida, estallido respiratorio y liberación de citoquinas. La interacción de la IgA con el receptor de las células fagocíticas tisulares puede representar una segunda línea de defensa en el caso de infecciones bacterianas.

Los niveles de todas las inmunoglobulinas, a excepción de la IgG en recién nacidos son muy bajos, siendo por tanto de gran significación el hecho de que la IgA se transfiera desde la madre al lactante a través de la secreción láctea. De ahí que tengamos que insistir en que los lactantes se amamenten en el mayor grado posible directamente por las madres y no con leche de otros orígenes, a lo que actualmente existe excesiva tendencia. La IgA recibida de la madre ejerce un importante papel de defensa a nivel de todo el aparato digestivo. Si el lactante se alimenta con leche materna, ésta le proporciona las moléculas de IgA, que pasan a su intestino cuando succiona la leche, en donde se unen a los microorganismos patógenos impidiendo que penetren las mucosas (Díaz, 2003).

## **2. Procesos que destruyen IgA:**

La destrucción de proteínas, tales como la inmunoglobulina A ocurre por distintos procesos a los que se ve sometida la leche materna, en estos procesos la proteína es desnaturalizada, es decir que cambia su estructura tridimensional, y de esta manera origina la pérdida de su función. La leche humana puede ser sometida a distintos procesos en donde la desnaturalización de proteínas ocurre por ciertas condiciones químicas y físicas, dentro de los que se pueden mencionar, la temperatura, acidez y contaminación. (Rojas & Guerrero, 1999).

Cuando la temperatura es elevada se aumenta la energía cinética de las moléculas con lo que se desorganiza la envoltura acuosa de las proteínas, y se desnaturalizan. Asimismo, un aumento de la temperatura destruye las interacciones débiles y desorganiza la estructura de la proteína, la cual está determinada por la actividad enzimática, de forma que el interior hidrofóbico interacciona con el medio acuoso y se produce la agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada. Habitualmente la desnaturalización a alta temperatura es irreversible, debido a que se rompen las fuerzas débiles de enlace al aumentar la vibración térmica de los átomos componentes, fenómeno que daña la estructura tridimensional

Por el contrario cuando las temperaturas son muy bajas es decir de  $-5$  a  $-10^{\circ}\text{C}$ , al ser temperaturas poco estables, existe la formación de cristales en donde se rompen las proteínas, entre ellas la IgA, lo que hace que la leche disminuya sus concentraciones en inmunoglobulinas y demás nutrientes. A temperaturas bajas, aunque la actividad enzimática procede muy lentamente, ella no se detiene del todo a menos que se inactiven previamente las enzimas, la leche materna congelada experimenta un considerable deterioro después de un almacenamiento prolongado (Hanson, 1999).

En un estudio realizado en Guatemala en bancos de leche humana de hospitales nacionales se observó que las temperaturas de  $-5$  a  $-10^{\circ}\text{C}$  resultaron ser poco estables, por lo que recomiendan que en los bancos de leche los controles comprendan la duración y la temperatura de almacenamiento de la leche materna extraída, pasteurización, enfriamiento rápido, congelamiento y almacenamiento del producto final (Winter y otros, 2011).

La leche es un fluido estéril y con poca acidez, puede llegar a contaminarse al pasar por los conductos mamarios, por lo que antes de donarla es necesario descartar unas gotas de leche. La contaminación de la leche también puede ocurrir si no existe una buena limpieza de los pechos, o cuando las temperaturas en las que se almacena no son estables, lo que logra que se descomponga y exista actividad enzimática y que promueva la destrucción de proteínas. Los microorganismos que pueden llegar a contaminar la leche materna pueden lograr una disminución en las concentraciones de los nutrientes, aumento de acidez de la leche y llegar a causar infecciones en los niños que la consuman (Serne, 2004).

La leche produce ácido láctico el cual puede medirse por medio de una titulación con hidróxido de sodio, y ser expresada en grados Dornic, se ha observado que la fermentación ácido láctica tiene lugar en general cuando se abandona la leche cruda durante algún tiempo a temperatura ambiente, es por ello que su almacenamiento a temperaturas adecuadas ayudan a mantenerla en las condiciones necesarias. Los microorganismos lácticos causantes de esta fermentación pueden ser homofermentativos que producen casi exclusivamente ácido láctico y cantidades mínimas de otras sustancias, o heterofermentativos, que producen además de aumentar la acidez de la leche, cantidades apreciables de productos volátiles, por lo que la leche con acidez muy alta es descartada ya que es indicadora de contaminación bacteriana. (Aguilar, 2000).

### **3. Importancia de la Inmunoglobulina A:**

La IgA es la principal inmunoglobulina que se encuentra en la leche materna y en el calostro, ésta protege tanto a la glándula mamaria como a las mucosas del lactante en el periodo en que la secreción de IgA en el niño es insuficiente. La leche materna contiene linfocitos B y linfocitos T, que se encuentran tanto en el calostro como en la leche madura y son las encargadas de sintetizar los anticuerpos IgA. El 50 % de los linfocitos B de la leche materna son portadores de anticuerpos IgA en su superficie (Xanthou, 2008).

Se sabe que en el calostro la IgA alcanza niveles de hasta 300 mg/mL y la disminuye en la segunda y tercera semana, permaneciendo constante en la leche materna. (Wilson, 2006).

En Brasil en el año 2008, se demostró que las concentraciones de IgA alcanzan de 100 a 140mg/100ml en la leche materna, y a la vez confirman que es esta la inmunoglobulina que se encuentra en mayores concentraciones en la leche humana (Xanthou, 2008).

La presencia de la IgA en la leche materna es de gran importancia ya que contribuye a una mejor inmunocompetencia en el recién nacido, factor que logra que los niños se mantengan sin infecciones durante el primer año de vida, en comparación con aquellos que han lactado en menor tiempo, siendo estos más vulnerables a infecciones.

Estudios experimentales han demostrado que una parte de los anticuerpos se acumulan en las células epiteliales del yeyuno proximal e interfieren con la adherencia de bacterias y

virus, es por ello que los anticuerpos IgA específicos se unen directamente a bacterias y virus y de este modo se inhibe la colonización del tracto gastrointestinal por microorganismos causantes de enfermedades (Xanthou, 2005).

El lactante a través de la leche materna recibe una cantidad importante de factores inmunológicos, entre ellos IgA, la cual protege la mucosa intestinal y previene la colonización del intestino por diferentes bacterias, por ejemplo: *E. coli*, *C. tetani*, *C. difteriae*, *K. pneumoniae*, *Salmonella*, *Shigella*, toxinas de *V. cólera* y cápsula del *H. influenzae*, y factores antiparasitarios contra *Giardia lamblia*, *E. hystolítica*, *S. mansony* y *Criptosporidium* (Solares, 2010).

En Guatemala se realizó un estudio en niños de edad pre-escolar, en donde se demostró que los niños amamantados presentan menores posibilidades de contraer una infección diarreica por microorganismos tales como; *E. coli*, *C. jejuni* y rotavirus, gracias a que los anticuerpos IgA que reciben de la leche materna, los protege contra la toxina lábil de *E. coli* y presenta una actividad neutralizante en *C. jejuni* y rotavirus (Gil, 2003)

Hasta el momento, ninguna leche de fórmula o de otros mamíferos podrá igualar la leche materna, debido a que estas no poseen inmunoglobulinas ni los nutrientes necesarios que suplen todas las deficiencias del recién nacido debido a la inmadurez inmunológica que posee.

Por lo anterior, es innegable la importancia que tiene la presencia de la IgA a través de la alimentación con leche materna, para la salud del niño sobre todo durante su primer año de vida, y el considerar a la leche humana procesada en un banco de leche como la segunda opción para la alimentación del lactante para poder seguir brindando los beneficios de la leche materna.

### **C. Ensayos de determinación de IgA**

La cuantificación de la inmunoglobulina A ha sido de importancia principalmente para determinar las ventajas de obtener una leche pasteurizada y poder mejorar las técnicas empleadas en bancos de leche humana, con el fin de poder brindar los beneficios

inmunológicos que proporciona la leche materna a los recién nacidos, principalmente aquellos que presenten alguna condición de riesgo (OMS, 2010).

En la actualidad, se utilizan tres técnicas principalmente para la detección de las concentraciones de IgA: cromatografías, espectrofotometría y turbidimetría (Raspini, 2010).

### **1. Cromatografías:**

La cromatografía es un método físico o de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y la física (Raspini, 2010).

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido. Una de las primeras técnicas utilizadas para cuantificar proteínas fue la cromatografía de afinidad, en donde se pueden obtener las inmunoglobulinas purificadas realizando lavados de las muestras, para no tener interferentes y que las concentraciones obtenidas sean realmente las de las proteínas y no de otras sustancias que puedan dar resultados falsos (Días, 2003).

Estudios realizados con cromatografías han demostrado que es un método confiable para cuantificar las concentraciones de proteínas, en este caso las inmunoglobulinas. Esto se ha verificado mediante electroforesis de poliacrilamida, en donde se ha determinado la presencia de la proteína en las muestras y conocer sus concentraciones al identificarse las bandas de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas de interés, y de esta forma comprobar la eficacia de técnicas utilizadas anteriormente (Avery, 2001).

### **2. Espectrofotometría:**

La espectrofotometría es el método de análisis óptico más utilizado en las investigaciones químicas y bioquímicas. Permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia (Gil, 2010).

En estudios realizados por esta metodología demuestran que éste es un análisis que permite la determinación de inmunoglobulinas de una forma más sencilla, sin embargo en un estudio realizado por Humbert y colaboradores demostraron que para el análisis por métodos espectrofotométricos es necesario el realizar un paso de aclaramiento de las muestras debido a una suspensión coloidal de caseína y a los glóbulos de grasa presentes en las leches los cuales obstruyen el paso de la luz a través del suero de la leche (Humbert, 2006).

### **3. Turbidimetría:**

En la actualidad uno de los métodos más utilizados para la detección de inmunoglobulinas es la turbidimetría, ésta se mide a 0 grados del haz incidente, la disminución de la intensidad se puede medir como porcentaje de turbidez en cualquier espectrofotómetro o autoanalizador. Es una prueba poco sensible y los porcentajes de determinación de concentraciones de inmunoglobulinas van del 70 al 90% (Hanson, 1999).

Las pruebas de inmunoturbidimetría para la detección cuantitativa de inmunoglobulinas se dan a longitudes de onda de 500 a 570 nanómetros, detectando la inmunoglobulina por medio de anticuerpos, principalmente se utilizan los anticuerpos de conejo y cabra los cuales forman compuestos insolubles al combinarse con la inmunoglobulina presente en el suero de la muestra.

Hartmann y colaboradores han descrito el método de turbidimetría como una metodología confiable, en su estudio determinaron concentraciones de IgA, IgG e IgM cuantificándolas en sueros de muestras de leche humana, en donde describen que esta metodología para la cuantificación de inmunoglobulinas presenta una sensibilidad de un 65% y un 85% de especificidad. En su estudio además demostraron que las inmunoglobulinas más abundantes en las muestras fueron IgA e IgG y que la leche pasteurizada presenta una concentración media de IgA de 26 mg/dL (Hartmann, 2006).

Asimismo, el método de turbidimetría ha dado a conocer las primeras concentraciones de inmunoglobulinas, y es considerado como uno de los métodos de ensayo más utilizados y disponibles a nivel comercial. Por otra parte, estudios como los desarrollados por Hartmann

y colaboradores, solo han sido probados en un número limitado de muestras y no han sido validados en ningún otro estudio.

Actualmente la única metodología comprobada para la determinación de concentraciones son la turbidimetría y espectrofotometría (Xanthou, 2005) (Hartmann, 2006).

#### **4. Técnica inmunoenzimática ELISA:**

Esta técnica forma parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados para poder visualizar la reacción antígeno-anticuerpo. Se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes, antígeno o anticuerpo, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto, podrán fácilmente ser revelada mediante la adición del sustrato, que al actuar sobre la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro (Hanson, 1999).

Existen varios estudios que demuestran que esta técnica cuantifica inmunoglobulinas, por lo que se han determinado las concentraciones de inmunoglobulina A en saliva y en leche humana. Por lo que este inmunoensayo ha comprobado ser una técnica altamente sensible y de gran especificidad, que permite realizar en un corto espacio de tiempo estudios sobre grandes poblaciones, de manera sencilla y económica, además de una buena reproducibilidad y facilidad en la interpretación de los resultados (Manchet, 2010).

#### **5. Identificación molecular:**

Actualmente no existen pruebas moleculares a nivel comercial para la cuantificación de inmunoglobulinas a partir de muestras clínicas. Los diferentes kits a nivel comercial con los que se cuenta son para la identificación definitiva a partir de muestras como saliva, leche y otras secreciones en donde se puedan encontrar inmunoglobulinas. La prueba de Dot blot es una prueba rápida basada en la detección y caracterización de inmunoglobulinas, se considera como el método de elección para la identificación definitiva de inmunoglobulinas en secreciones como leche materna. Esta prueba permite la diferenciación entre las dos subclases de IgA, que son la IgA1 e IgA2 una monomérica y la otra polimérica (Behrman, 2005).

Manchet y colaboradores han descrito un método utilizando reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR), para detectar la presencia de IgA en leche materna. Se evaluó su eficiencia en calostro y leche madura fijadas en parafina, obteniendo una sensibilidad global de 100% y especificidad de 98.4%, pero todavía no se encuentran disponibles a nivel comercial (Manchet, 2010).

Asimismo, se han descrito los primeros estudios para cuantificar concentraciones de IgA en secreciones humanas por PCR para permitir la diferenciación de las subclases por este método, pero no se encuentran disponibles a nivel comercial y solamente se han utilizado a nivel de investigación (Behrman, 2005).

#### **D. Bancos de leche humana**

Los bancos de leche humana son centros especializados responsables de la promoción, protección y apoyo a la lactancia materna, además de ser responsables de la recolección, procesamiento y distribución de la leche materna extraída con calidad certificada a cualquier niño que la precise (Ibáñez, 2008).

Es por ello que la OMS considera a los bancos de leche humana como una estrategia efectiva para proteger el amamantamiento y disminuir la morbi-mortalidad infantil, a través de la provisión de leche pasteurizada a niños prematuros (Serne, 2004).

##### **1. Historia:**

La primera donación de tejidos o sustancias biológicas, con el fin de ayudar el estado de salud, surgió de las mujeres al donar leche materna.

A finales del siglo XIX y principios del XX se dificultó la donación de leche materna por lo que surgen los “bancos de leche humana”. Sin embargo con la pandemia de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), y saber que la leche materna podía ser un medio para transmitir la infección; los bancos de leche detuvieron su desarrollo e incluso algunos de estos centros fueron desapareciendo (Ayela, 2009).

Actualmente se ha demostrado que el procesamiento de la leche en un banco de leche humana es seguro y disminuye los riesgos en cuanto a la transmisión de enfermedades,

principalmente ha quedado libre de la transmisión de virus, entre ellos el VIH ya que al someterse a un proceso de pasteurización a temperaturas arriba de 56°C, los virus se eliminan, por lo que estos procesos han aumentado las demandas por brindar al recién nacido leche materna y aún más para niños prematuros, ocasionando la expansión de estos centros de servicio (Asociación Española de Pediatría, 2008).

Organizaciones de importancia a nivel mundial como la OMS y la organización panamericana de la salud (OPS) en el siglo XXI, han recomendado que cuando no se disponga leche de la propia madre, la siguiente opción para la alimentación del niño es la leche pasteurizada de madres donantes seleccionadas, sobre todo si se trata de niños prematuros o enfermos. Los bancos de leche humana fueron acreditados por la OMS en el año 2,001 como una de las mejores estrategias sanitarias para la disminución de la mortalidad infantil y protección del amamantamiento.

En el año 2,007 nace la red iberoamericana de bancos de leche humana (BLH), producto del acuerdo alcanzado entre los jefes de estado y de gobierno de Iberoamérica, quienes a la fecha contribuyen en las aperturas de bancos de leche humana, capacitando y brindando la información necesaria sobre el tema (OMS, 2010).

## **2. Funcionamiento del banco de leche:**

Funcionan con la obtención de leche de madres donadoras quienes residen en las cercanías del hospital en donde se lleva a cabo la recolección, procesamiento, control de calidad y distribución, a las que previamente se les realiza un estudio para descartar que padezcan de enfermedades infecciosas como el VIH o hepatitis (Lanceld, 2003).

El líquido donado es recogido por una unidad móvil, o en el mismo hospital o centro de recolección, siguiendo la normativa de la red iberoamericana de bancos de leche humana. La leche materna donada es procesada, para ser empleada para alimentar a bebés que no pueden recibir leche de su propia madre. La administración de la leche materna resulta particularmente eficaz para alimentar a recién nacidos de riesgo, ya sea por ser prematuros, bajos de peso u otra razón que ponga en peligro su salud (Rojas, 1999).

### **3. Bancos de leche humana en el mundo:**

En el mundo existen varios países que cuentan con bancos de leche dentro de los que podemos mencionar: Reino Unido, Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, Cuba, México, Argentina, Brasil, Venezuela, Ecuador, entre otros, quienes cuentan con el apoyo de la asociación de bancos de leche (OMS, 2010).

Los bancos de leche humana a nivel mundial, cumplen una función importante en la preservación de la vida de los recién nacidos, brindando una alimentación adecuada al garantizar que la leche materna llegue a niños cuyas madres no pueden amamantarlos, es por está y muchas razones más, que varios países en el mundo han abierto bancos de leche humana. Estos centros reciben, pasteurizan y distribuyen la leche a niños que según sus condiciones de salud requieran de este vital fluido (Lanceld, 2003).

Brasil, implantó el primer banco de leche humana en el año de 1,943 y a partir del año de 1,985 este país experimento una expansión de las unidades hasta entonces nunca antes registrada en la historia, por lo que es el país que cuenta con la mayor red de bancos de leche humana reconocido por la organización mundial de la salud (OMS), contando con 108 puestos de colecta y 206 bancos de leche humana, haciendo un total de 314 bancos de leche en todo el país, obteniendo una vasta experiencia y un gran historial muy positivo de varias décadas, sin casos de infección o contaminación, logrando una cultura de amamantamiento y una entrega anual de millones de litros de leche humana.

Las Agencias internacionales UNICEF y OPS, entre otras, regulan el apoyo para impulsar una red latinoamericana de bancos y multiplicar el número de lactantes que pueden acceder a estos beneficios, coadyuvando a alcanzar los objetivos del milenio, en especial los referidos a la reducción de la mortalidad materno-infantil en la región (Moreira, 2011).

### **4. Bancos de leche humana en Guatemala:**

En el año 2,005 se realizó el II Congreso Internacional en la ciudad de Brasilia, con la participación de once países entre ellos Guatemala, en donde los participantes acordaron la construcción de la red latinoamericana de bancos de leche humana y firmaron el 18 de mayo el protocolo internacional llamado Carta de Brasilia, por el Doctor Miguel Ángel

Soto Galindo, en representación de Guatemala, en donde se iniciaron las primeras acciones para inaugurar el primer banco de leche humana en Guatemala y Centroamérica el 10 de marzo del 2008, en el Hospital Nacional Pedro de Bethancourt en la Antigua Guatemala. El acuerdo ministerial 748-10 que crea y regula el funcionamiento de los bancos de leche en Guatemala, entro en vigencia en agosto del año 2010 y el Programa de Seguridad Alimentaria y Nutricional (PROSAN), es el ente normativo del Ministerio de Salud Pública en Guatemala. creando una estrategia para reducir la mortalidad neonatal (Moreira, 2011).

Actualmente se encuentran funcionando los bancos de leche humana del Hospital Nacional de Antigua, Hospital Roosevelt, Hospital General San Juan de Dios, Hospital Regional Santa Elena en Quiché, Hospital Regional de Zacapa, y en proceso de inauguración el del Hospital Regional de Cobán y en proceso de implementación el del Hospital Regional de Cuilapa y Totonicapán.

El Hospital de Antigua, es un banco de leche humana de referencia a nivel centroamericano, nombrado “Amigo de la leche materna” por organizaciones internacionales como UNICEF y la OPS.

Cabe mencionar que en Guatemala la Comisión Nacional de Promoción de la Lactancia Materna (Conaplam), junto con el apoyo de organizaciones nacionales e internacionales, promueven y protegen la lactancia materna, impulsando el desarrollo y apertura de nuevos bancos de leche humana en el país.

La participación del personal médico y paramédico de los hospitales de la red nacional es fundamental en la información a los padres de familia sobre los beneficios nutricionales, inmunológicos, psicológicos y sociales de la leche materna, por lo que promueven su donación y la utilización de la leche pasteurizada en los neonatos y en el éxito del objetivo primordial de la reducción en la morbi-mortalidad neonatal e infantil en Guatemala (Soto & Moreira, 2007).

## **E. Procedimientos en los bancos de leche**

La leche humana donada, no debe presentar microorganismos en cantidad o calidad capaces de representar agravios a la salud de los recién nacidos. De esta forma, es preciso que se disponga de procedimientos capaces de asegurar la calidad sanitaria de la leche humana extraída.

El banco de leche humana del Hospital Nacional “Pedro de Bethancourt”, realiza varias fases de procesamiento a la leche materna durante su estancia en ese centro, las cuales fueron tomadas del manual de funciones y procedimientos de los bancos de leche de Brasil. Todos estos procedimientos han sido evaluados por la red Iberoamericana de bancos de leche humana, la OPS, UNICEF, la world alliance for breastfeeding action y la international baby food action network, entre otros, en donde han puesto a Brasil como el líder de bancos de leche humana, siendo este país el que capacita y da las guías para el procesamiento de leche humana en los distintos países que cuentan con bancos de leche (OMS, 2010).

Durante el procesamiento de la leche humana en el banco de leche, esta pasa por varias fases en donde las concentraciones de sus componentes sufren variaciones, principalmente sus proteínas las cuales se destruyen en los procesos a los que se ve sometida. Es por ello que es de gran importancia que la leche materna procesada en un banco de leche contenga los nutrientes necesarios que ayuden a fortalecer el sistema inmunológico del neonato, ya que el almacenaje y procesamiento de la leche donada altera algunas de las propiedades inmunológicas y nutricionales (Manrique, 2008).

### **1. Recolección:**

Es la recopilación de la leche materna, la cual constituye la primera etapa, a través de la extracción de la leche materna en forma manual o con extractores eléctricos, también existe recolección de leche por la vía domiciliar, la cual es recogida por unidades móviles que pertenecen al hospital, la que se recolecta se coloca en frascos esterilizados y rotulados. La fase de recolección no presenta ninguna pérdida de nutrientes ya que únicamente es almacenada en frascos de vidrios debidamente identificados (Rodríguez, 2009).

## **2. Selección y clasificación:**

La leche recolectada es congelada a temperaturas de  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $-10^{\circ}\text{C}$  por un tiempo máximo de cinco días, se descongelan en baño María a  $40^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 15 minutos con agitación constante. Durante la selección y clasificación, se realiza el análisis del off flavor, que consiste en el análisis de olor, color, es decir es un indicador sensorial de no conformidad. El color normal de la leche es blanco o amarillo suave, sin embargo varía de acuerdo a la dieta de la madre, así como a la fracción que predomine. Además debe evaluarse el olor y sabor de la leche, por funcionarios capacitados para esta labor. Por último deberá verificarse la presencia de suciedades o cuerpos extraños.

La fase de congelación, es una fase crítica del procesamiento de la leche, ya que las temperaturas de congelación de  $-5$  a  $-10^{\circ}\text{C}$  no son estables, por lo que forman cristales grandes que van destruyendo proteínas, tales como la IgA y permiten el crecimiento bacteriano haciendo que la concentración de inmunoglobulina disminuya (Ibañez, 2008)

En estudios realizados por Cordero y colaboradores demostraron que los congelamientos de la leche humana hacen que las concentraciones de inmunoglobulinas disminuyan en un 10 al 15% a temperaturas de  $-3$  a  $-10^{\circ}\text{C}$ , debido a que la carga bacteriana aumenta y por lo tanto las bacterias disminuyen las concentraciones de inmunoglobulinas y aumentan la acidez de la leche materna (Méndez, 2009).

## **3. Determinación de acidez Dornic y Crematocrito:**

Se realiza la medición de la acidez por triplicado y se anota el promedio del número de acidez Dornic obtenido. Esta se realiza con hidróxido de sodio 0.111 N, utilizando como indicador fenolftaleína. El punto final de la titulación ocurre cuando el indicador cambia a color rosado claro.

Cada 0.01 ml ya corregido por el factor de hidróxido equivale a 1.0 grado Dornic. El límite de acidez Dornic para la leche es de 1 a 8 grados Dornic (Schanler & Hurts, 2005).

La determinación de crematocrito, se realiza con el procedimiento utilizado para hematocrito, en capilares y centrifugándolos por 15 minutos a las revoluciones que el fabricante indique, el crematocrito permite establecer las calorías que aportan 1000 ml de leche materna, y éste se emplea para calcular el porcentaje de crema y contenido calórico (Kcal) de muestra de leche (Soto & Moreira, 2007).

#### **4. Pasteurización:**

La pasteurización es el tratamiento térmico, aplicado a la leche humana se realiza con el objeto de desactivar el 100% de los microorganismos patógenos y 99,99% de la microbiota saprofita. Para ello se pasteurizan a 62.5°C por 30 minutos, para que ocurra la letalidad térmica. Luego se promueve el enfriamiento a través de inmersión en agua desionizada y 20% de alcohol al 95%. Este baño frío tiene una temperatura de 5 °C y se enfrían por un tiempo de 15 minutos.

El proceso de pasteurización es uno de los procesos en los que se ve afectada las concentraciones de inmunoglobulina en la leche, esto es debido a la desnaturalización de las proteínas, al someterlas a temperaturas mayores de 50°C. En la pasteurización se da lugar a una pérdida variable de componentes de la leche, dentro de los que se puede mencionar un 50% de pérdida de lactoferrina, 100% de linfocitos, 80% lipasa, 65% lactoferrina y un 30 a 50% de IgA (Ibañez, 2008).

La técnica de pasteurización de Holder es el método comúnmente empleado, en donde se pasteuriza a 62.5 °C por 30 minutos, el procesamiento ha resultado ser una estrategia alternativa de rápido calentamiento y enfriamiento de la leche con potencialmente menos destrucción de los componentes de la leche (Méndez, 2003).

#### **5. Análisis microbiológico de la leche pasteurizada:**

La leche humana es estéril y en el trayecto por los conductos se contamina con las bacterias que colonizan el conducto mamario, por lo que se recomienda descartar las primeras tres gotas de leche de cada pecho antes de la recolección para disminuir la carga bacteriana.

Por medio de la metodología clásica descrita en el Compendium Standard Methods for Examination of Dairy Products fue desarrollada una metodología alterna, conocida como la técnica del método del número más probable, para la detección de coliformes totales, consiste en inocular cuatro alícuotas de 1ml en cada uno de los tubos de 10ml de caldo bilis verde brillante al 5% p/v, con campanilla de Durham, luego de incubarlos a 36 °C por 48 horas observando la formación de burbuja de gas cada 24 horas. Si no hay formación de gas se procede reportar como coliformes negativo y el frasco puede ser almacenado para su

distribución posterior. El congelamiento de los frascos con reporte negativo de coliformes, es a  $-18^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Por el contrario si a las 24 o 48 horas se observa formación de gas se realiza el test confirmatorio para coliformes, inoculando en medio bilis verde brillante 0.01ml del tubo del test primario. Se incuba el tubo a  $36^{\circ}$  centígrados por 24 a 48 horas. Si a las 24 o 48 horas se observa formación de gas se confirma la presencia de coliformes fecales. El frasco de leche debe descartarse inmediatamente (Moreira, 2011).

#### **6. Distribución de la leche humana:**

Luego del procesamiento de la leche humana donada y obteniendo del producto final un control de calidad adecuado, se distribuye a los lactantes que presenten una o más indicaciones como las siguientes: prematuros o recién nacidos de bajo peso, o enfermos, especialmente a niños con entero-infecciones, con diarreas, o con deficiencias inmunológicas y en ocasiones a niños que según el criterio del médico necesitan de esta leche (Solares, 2010).

#### **F. Leche materna pasteurizada**

La leche materna pasteurizada es considerada como la leche que es procesada en un banco de leche humana, es decir que ha pasado por los procesos de recolección, congelación, pasteurización, análisis microbiológico y ha sido distribuida a los neonatos con calidad garantizada por el banco de leche.

La leche pasteurizada al igual que la leche materna tiene innegables beneficios para el lactante, por tener la concentración adecuada de grasas, proteínas y lactosa, además de las enzimas que facilitan su digestión por ser de muy fácil absorción, lo que hace que se aprovechen al máximo todos sus nutrientes, sin producir estreñimiento ni sobrecarga renal (Manrique, 2008).

Los niños que no pueden ser amamantados por su propia madre, pueden tener la opción de poder recibir leche pasteurizada, la cual brindara los componentes nutritivos e inmunológicos que necesita su organismo.

Además se ha notado que mejora el crecimiento de los niños prematuros, con menor morbilidad, mejor pronóstico visual, auditivo y desarrollo psicomotor; protegiéndolos contra la obesidad, infecciones agudas y enfermedades como diabetes, enfermedad celíaca, intestinal y algunos tipos de cáncer de la niñez cuando son alimentados con leche materna pasteurizada y no con fórmulas artificiales, aunque éstas estén preparadas especialmente para prematuros (García, 2008).

### **1. Beneficios inmunológicos:**

La leche materna es indispensable para formar un eficiente sistema inmunitario en el niño y para sentar las bases de una buena salud general para el adulto. Es por ello que ya sea que la madre alimente al niño de su propia leche o de leche pasteurizada, se ha observado que rara vez presentan enfermedades digestivas, u otras enfermedades como las respiratorias, otitis y alergias. Además que brinda efectos protectores frente a patógenos entéricos o de otro tipo y representan un porcentaje importante entre los niños con menor riesgo de morbilidad.

Es importante resaltar que la leche pasteurizada a diferencia de la artificial, contiene anticuerpos frente a bacterias y virus, en donde son incluidas las concentraciones relativamente elevadas de IgA, que evitan la adherencia de microorganismos a la mucosa intestinal. Estos anticuerpos proporcionan una inmunidad gastrointestinal frente a los microorganismos que utilizan esta vía de entrada, y son responsables, al menos en parte, de la menor incidencia de diarrea, neumonía, bacteriemia y meningitis en los niños alimentados exclusivamente con leche materna o pasteurizada durante el primer año de vida frente a los que reciben fórmulas artificiales durante sus primeros cuatro meses de edad (Behrman, 2005).

Además de las enfermedades anteriormente mencionadas también protege al niño frente a catarros, bronquiolitis, infección urinaria, enterocolitis necrotizante, o síndrome de muerte súbita en el lactante, también le protege de enfermedades futuras como asma, alergia, obesidad, enfermedades inmunitarias como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa y arteriosclerosis o infarto de miocardio en la edad adulta y favorece su desarrollo intelectual. (García, 2008).

## IV. Justificación

Los bancos de leche humana a nivel nacional como internacional, han cobrado mayor auge a causa de la labor que realizan al brindar leche pasteurizada a niños que no pueden ser alimentados con leche de su propia madre, con los beneficios inmunológicos de la leche materna (Díaz, 2003).

Guatemala cuenta con cinco bancos de leche funcionando, siendo el principal el del Hospital Nacional “Pedro de Bethancourt” en la Antigua Guatemala; reconocido por el Ministerio de Salud Pública como el de mayor importancia en el país. Los bancos de leche como centros especializados, someten la leche humana a distintas fases de procesamiento tales como: recolección, pasteurización, congelación y descongelación, garantizando así un producto con calidad certificada al neonato que la recibe (Moreira, 2011).

Actualmente están demostrados los beneficios inmunológicos de la leche materna, principalmente por su aporte de inmunoglobulina A, la cual es una proteína que se transfiere al niño por el consumo de leche humana y son anticuerpos que actúan como la defensa inicial contra patógenos invasores en el periodo en que la secreción de IgA es insuficiente en el lactante. La leche humana pasteurizada, es considerada como la segunda opción para la alimentación del neonato, ya que aunque sea sometida a varios procesos continúa aportando los componentes nutritivos e inmunológicos que el niño necesita, tales como la IgA, lo cual no proporciona la leche artificial (OMS, 2010).

El objeto de estudio de la presente investigación es determinar los porcentajes de las concentraciones de IgA presentes en la leche materna, al finalizar cada una de las fases de procesamiento a las que se somete en el banco de leche, con el fin de que dicho banco pueda introducir modificaciones en el procesamiento para brindar un mejor producto final al neonato.

Los resultados fundamentarán el apoyo y la promoción de los bancos de leche humana a nivel nacional, para la provisión de leche pasteurizada como un aporte inmunológico de anticuerpos naturales como la IgA, favoreciendo a los neonatos principalmente a aquellos que presenten alguna condición de riesgo.

## **V. Objetivos**

### **A. General**

Establecer las concentraciones de inmunoglobulina A total (IgA) promedio que contiene la leche materna al iniciar cada fase del procesamiento al que se somete en un banco de leche humana.

### **B. Específicos**

1. Establecer las concentraciones de IgA en la leche materna al finalizar cada una de las fases de procesamiento.
2. Determinar la concentración de IgA presente en la leche materna procedente del banco de leche humana antes de su administración al neonato.
3. Identificar la fase del proceso que afecta principalmente las concentraciones de IgA en la leche materna.

## **VI. Hipótesis**

Las concentraciones de IgA disminuyen significativamente al finalizar cada fase del procesamiento en el banco de leche humana.

## **VII. Materiales y Métodos**

### **A. Universo**

Leche materna de madres donadoras que acuden al banco de leche humana del Hospital Nacional “Pedro de Bethancourt” de la Antigua Guatemala, en el departamento de Sacatepéquez.

### **B. Muestra**

Muestra: 20 muestras de leche, en cuatro fases distintas del procesamiento de la leche materna proveniente del universo descrito anteriormente.

### **C. Recursos**

#### **1. Recursos humanos**

- A. Investigadora: María Stephanie Lissette Linares Saucedo
- B. Asesor: Lic. Gerardo Arroyo
- C. Coasesor: Licda. Renata Moreira

#### **2. Recursos institucionales**

- A. Banco de leche humana del Hospital Nacional “Pedro de Bethancourt” de la Antigua Guatemala, en el departamento de Sacatepéquez.
- B. Laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt de Guatemala.

### **D. Materiales**

#### **1. Equipo**

- A. Analizador de Química BioSystems A25
- B. Baño maría
- C. Refrigerador
- D. Microcentrífuga
- E. Centrifuga Eppendorf 5810 R

## **2. Reactivos**

- A. Kit de reactivos, para concentraciones de IgA total mediante turbidimetría utilizando anticuerpos de cabra anti-IgA (BioSystems S. A.).
- B. Fenolftaleína
- C. Hidróxido de sodio 0.1N

## **3. Cristalería**

- A. Frascos de 25 mL
- B. Tubos de vidrio Vacutainer de 3 mL
- C. Microbureta
- D. Capilares

## **4. Otros**

- D. Bata
- E. Baterías de Hielo
- F. Cofías
- G. Copas de Reacción
- H. Guantes descartables
- I. Gradilla
- J. Etiquetas
- K. Extractores de leche
- L. Fósforos
- M. Hielera
- N. Mascarilla
- O. Mechero
- P. Pipeta automática con volumen variable, de 100-1000  $\mu$ L
- Q. Termómetro
- R. Tips descartables

## **E. Procedimientos**

### **1. Fases de Procesamiento:**

#### **a. Fase de extracción:**

Esta fase consiste en la extracción de la leche materna de las donadoras que acuden al banco de leche por medio de extractores, en donde se realizan los pasos que se describen a continuación:

- La madre donadora ingresa al banco de leche
- Lavar manos, pechos y pezones de la madre donadora
- Colocarse de bata y cofia
- Descartar las primeras tres gotas de leche de cada pecho
- Colocar el extractor de leche en uno de los pechos, debe vaciarse un pecho primero y luego el otro hasta que deje de salir de salir leche.
- Colocar la leche extraída en frascos de vidrio de 25 mL y rotularlos.
- Realizar el pool de leche, añadiendo leche materna extraída a los frascos de vidrio hasta que lleguen a un volumen igual o mayor de 5 onzas.
- Congelar las muestras a una temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $-10^{\circ}\text{C}$  por un tiempo máximo de 5 días.

#### **b. Fase de descongelación I:**

En esta fase la leche es descongelada, para luego ser analizada en su color, olor, acidez Dornic, crematocrito y obtener su contenido de kilocalorías, para lo cual se realiza el siguiente procedimiento:

- Descongelar a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  a  $40^{\circ}\text{C}$  en baño María, por un tiempo aproximado de 10 a 15 minutos.
- Realizar la determinación de off flavor de la leche humana, que corresponde a la determinación del olor y color de la leche; además se debe observar que no posean cuerpos extraños.
- Tomar de cada frasco descongelado 4 alícuotas de 1mL y colocarlas en cuatro tubos de ensayo de la siguiente manera: 1 alícuota para determinación de crematocrito y 3 alícuotas para determinación de acidez Dornic.

- Agregar a los tubos designados para medir acidez una gota de fenolftaleína y titular con hidróxido de sodio 0.11 Normal, hasta que cambie de color rosa y según las gotas de hidróxido de sodio utilizado para llegar al cambio de color así será la acidez, equivaliendo 0.01 ml equivale a 1 de acidez
- Medir el crematocrito llenando tres capilares por muestra, sellarlos y centrifugándolos a 5,000 rpm por 15 minutos. Medir en milímetros la grasa y la leche. Calcular el crematocrito por promedio de los tres capilares y calcular a partir del resultado las kilocalorías con las fórmulas anteriormente planteadas.

### **c. Fase de Pasteurización:**

La fase de pasteurización consiste en someter las muestras de leche a la eliminación de microorganismos a una temperatura de 62.5 °C y luego introducirlos a un choque térmico a una temperatura de -5°C para detener la desnaturalización de proteínas, además de realizarse un análisis microbiológico para coliformes totales. Los pasos se describen a continuación:

- Llenar los frascos de leche hasta un volumen de 5 onzas, bajo condiciones estériles; frente al mechero e identificando adecuadamente los frascos
- Cerrar bien los frascos y colocarlos en una bandeja en baño María a una temperatura del agua de 64.9°C para ser pasteurizados
- Esperar 15 minutos para que el baño María llegue a una temperatura de 62.5°C.
- Al llegar a 62.5°C dejar ahí por 30 minutos.
- Agitar frecuentemente los frascos y medir temperatura cada 5 minutos.
- Luego de la pasteurización, después de los 30 minutos, transferir los frascos a un baño frío para que exista un choque térmico, a una temperatura de -5°C por 15 minutos.
- Sacar los frascos del baño y realizar el análisis microbiológico, para determinar la presencia de coliformes totales
- Colocar en un tubo de bilis verde brillante con campanilla de Durham, cuatro alícuotas de 1 ml de cada frasco de leche pasteurizado en un tubo de 10 ml bilis verde brillante de diferentes puntos del mismo frasco e incubarlos a 36°C centígrados por 24 horas.

- Observar presencia de gas a las 24 horas si es negativo observar a las 48 horas si continúa negativo descartar los tubos.
- Refrigerar los frascos de leche a -18 a -20° C por 48 horas hasta que el cultivo salga negativo.

**d. Fase de descongelación II:**

En esta fase se realiza una segunda descongelación, luego de que la leche a cumplido con un análisis microbiológico negativo para coliformes totales, es distribuida al servicio de recién nacidos, en donde es descongelada para dársela al neonato.

- Proceder a colocar los frascos con cultivo para coliformes negativo luego de 48 horas de observación en el congelador a -18 a -20 °C.
- Distribuirlos según las solicitudes que llegan al banco de leche
- Al llegar a ser utilizados, el servicio de recién nacidos descongela la leche cada 3 horas.
- Descongelar los frascos de leche en baño María a 40°C por un tiempo de 10 a 15 minutos.

**2. Determinaciones de IgA:**

Este procedimiento se realiza con un equipo de turbidimetría, en donde se realizará el análisis de IgA proveniente de 20 muestras que sufren distintas fases de procesamiento, obteniendo las concentraciones de IgA en mg/dL. Procedimiento:

- Encender el mechero y en un área limpia colocar los frascos de muestra.
- Homogenizar la muestra, moviendo ocho veces para la derecha y ocho veces para la izquierda en forma circular, abrir el frasco y flamear la boquilla.
- Tomar una alícuota de 2 mL de cada frasco de cada una de las cuatro fases anteriormente descritas y colocarlo dentro de los tubos Vacutainer de vidrio, debidamente identificados, flamear la boquilla y cerrar el frasco y el tubo.
- Colocar en gradilla y trasportarlos en cadena de frío a una temperatura de aproximadamente de 5° C en la hielera.
- Descongelar el reactivo para IgA de anticuerpos de cabra anti-IgA (BioSystems S. A.) a 37° C.

- Centrifugar las muestras a 3,000 rpm a 4° C por 10 minutos
- Con una pipeta automática se tomar 600 µl del suero en copas de reacción y colocarlas en la gradilla del equipo.
- Colocar el reactivo en el equipo BioSystems A 25, en donde se utiliza 0.455 ml de reactivo de IgA, por muestra, leídas a 320 nm.
- Esperar y anotar concentración en mg/dL

## **F. Diseño Experimental**

El diseño utilizado fue un diseño de bloques completos, sin aleatorización. Cada uno de los bloques consistió en un pool muestras de leche materna, procedentes de madres donadoras que ingresan al banco de leche humana del Hospital Nacional “Pedro de Bethancourt” de la Antigua Guatemala, analizándose cada una de las muestras en sus fases de procesamiento en el banco de leche, consistiendo en cuatro fases; la primera luego de la extracción de leche de la madre, la segunda después de la descongelación I, la tercera posterior a la fase de pasteurización y la cuarta posterior a la fase de descongelación II, que es la que es previa a que el neonato tome la leche.

El nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . Se asumió una diferencia mínima entre los grupos en función de la desviación estándar que se tenga al realizar las mediciones, con un error de diseño= 1.5, siendo un total de 20 bloques los que se analizaron con cuatro repeticiones cada uno, que representan las cuatro fases de procesamiento de la leche durante su estancia en el banco de leche humana.

### **1. Criterios de Inclusión:**

20 muestras de leche materna, obtenidas de un pool de muestras de leche provenientes de madres donadoras, que hayan sido madres seleccionadas por funcionarios del banco de leche, con muestras que contengan un volumen mayor o igual a 5 onzas, leche color blanca o amarillenta, congelada luego de su extracción a una temperatura de -5 a -10 °C, sin presencia de cuerpos extraños, con acidez Dornic menor o igual a 8, un contenido de kilocalorías mayor a 385 y un análisis microbiológico para coliformes totales negativo; procesadas en el banco de leche del Hospital Nacional “Pedro de Bethancourt”.

## **2. Análisis de Resultados:**

- Se realizó una prueba de homocedasticidad por medio de la prueba de Levene, para determinar si hay igualdad de varianzas.
- Se realizó una prueba de normalidad de las cuatro fases de procesamiento de las 20 muestras con la prueba de Shapiro-Wilks, con el fin de contrastar la normalidad en los datos.
- Si los datos cumplen con homocedasticidad y normalidad entonces se hará un análisis de varianza de dos vías y de haber diferencia significativa se procederá a la prueba de Fisher de la mínima diferencia significativa para la comparación de las fases del proceso con la concentración de IgA inicial presente en cada una de las muestras como control.
- Si no se cumple la homocedasticidad y/o normalidad, se aplicará la prueba no paramétrica de Friedman. Si hubiera diferencia significativa, se realizarán comparaciones pareadas de las fases frente al control.

## VIII. Resultados

Para evaluar la variación de las concentraciones de IgA, se tomaron alícuotas de 20 muestras de leche durante las cuatro fases críticas del procesamiento, realizadas en el banco de leche humana del Hospital Nacional “Pedro de Bethancourt” de Antigua Guatemala.

La tabla No.1 presenta la relación entre la concentración de IgA, respecto al contenido calórico y acidez Dornic en las muestras de leche materna. Estos datos establecen que de las 20 muestras analizadas, 3 contenían una concentración promedio de inmunoglobulina de 53.6 mg/dL, un contenido calórico de 394 Kcal/L, y 2 grados de acidez Dornic, en 12 muestras las concentraciones de IgA fue de 37.5 mg/dL, 500.5 Kcal/L y acidez Dornic de 3 grados; en 4 muestras las concentraciones promedio fueron de 26 mg/dL con un contenido calórico de 686 Kcal/L y acidez de 4 grados Dornic y en una muestra la concentración de IgA fue de 20 mg/dL, contenido calórico de 881 Kcal/L y 5 grados de acidez Dornic (ver tabla No 1).

**Tabla No.1 Concentraciones promedio y desviación estándar de IgA respecto a su contenido calórico y acidez Dornic**

No. de muestras	Concentración de IgA mg/dL (DE*)	Contenido calórico Kcal/L (DE)	Acidez Dornic Unidades
3	53.6 (5.45)	394.0 (0)	2
12	37.5 (6.29)	500.5 (70.5)	3
4	26.0 (6.66)	686.0 (21.9)	4
1	881	20.0	5

Fuente: Datos obtenidos en el banco de leche humana del Hospital Nacional “Pedro de Bethancourt” y laboratorio de inmunología del Hospital Roosevelt

\*DE = desviación estándar

La tabla No.2 contiene las concentraciones de 20 muestras por fase de procesamiento. En la fase I se obtuvo una concentración mínima de 20 y máxima de 59 mg/dL de IgA, con promedio de 37.05 mg/dL, que corresponde al 100% de inmunoglobulina A en la muestra de leche materna. En la fase II concentraciones de 12 a 54 mg/dL, promedio de 29.8 mg/dL representando 80.4% de IgA. En fase III se observaron concentraciones de 7 a 49 mg/dL, con promedio de 23.55 mg/dL y 63.6% de inmunoglobulina, y en la fase IV se obtuvo el 48.5% de IgA, con concentración máxima de 41 mg/dL y mínima de 1 mg/dL, con un promedio de 17.95 mg/dL.

Se esperaba que todas las muestras presentaran 50% o más de concentración de IgA, sin embargo en la fase IV se observaron concentraciones de hasta 1 mg/dL por lo que el porcentaje disminuyó significativamente un 48.5% de inmunoglobulina A al finalizar las cuatro fases del procesamiento.

**Tabla No.2. Concentraciones de IgA en leche materna en las fases de procesamiento**

Concentración por Fase	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
Promedio: mg/dL (%)	37.05 (100)	29.80 (80.4)	23.55 (63.6)	17.95 (48.5)
Desviación Estándar	10.60	10.52	9.86	10.18
Concentración				
Mínima y Máxima: mg/dL	20-59	12-54	7-49	1-41

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el banco de leche humana del Hospital Nacional "Pedro de Bethancourt" y laboratorio de inmunología del Hospital Roosevelt. Fase I: fase de extracción, fase II: descongelación I, fase III: pasteurización, fase IV: descongelación II

En la tabla No. 3 se observa el análisis de las cuatro fases de procesamiento, los resultados muestran como disminuye la concentración de IgA al pasar la muestra de leche por cada una de las fases, es decir de la fase I a la fase II la concentración de IgA disminuyo 7.25 mg/dL, de la fase II a la fase III 6.25 mg/dL y por último cuando paso a la fase IV perdio 5.6 mg/dL de IgA, reduciendo a la vez los porcentajes de concentración de inmunoglobulina, entre la fase I y II en 19.6% ( $2.50 \times 10^{-13}$ ), entre fase II y III en 16.8% ( $3.48 \times 10^{-11}$ ) y entre fase III y IV en 15.3% ( $9.05 \times 10^{-10}$ ) de concentración de IgA.

**Tabla No.3 Diferencias de concentraciones de IgA entre fases las cuatro fases de procesamiento**

Concentración promedio de IgA entre fases mg/Dl		Diferencia de valores de concentración promedio de IgA mg/dL (%)	Valor de p *
Fase I: 37.05(100)	Fase II: 29.8(80.4)	7.25 (19.6)	$2.50 \times 10^{-13}$
Fase II: 29.8(80.4)	Fase III: 23.55(63.6)	6.25 (16.8)	$3.48 \times 10^{-11}$
Fase III: 23.55(63.6)	Fase IV: 17.95(48.5)	5.6 (15.3)	$9.05 \times 10^{-10}$

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el banco de leche humana del Hospital Nacional "Pedro de Bethancourt" y laboratorio de inmunología del Hospital Roosevelt

\*valor de p de la prueba de Fisher de la mínima diferencia significativa

También se relacionaron los días de congelación a temperaturas de -5 a -10°C con las concentraciones que se obtienen luego de ser descongelados, los resultados se muestran en la tabla No.4, donde 6 muestras congeladas por 1 día contenían 47 mg/dL de IgA, en las muestras congeladas por 2 días se observaron concentraciones de 33.8 mg/dL y en 4 días de congelamiento 29 mg/dL de inmunoglobulina (ver tabla No.4).

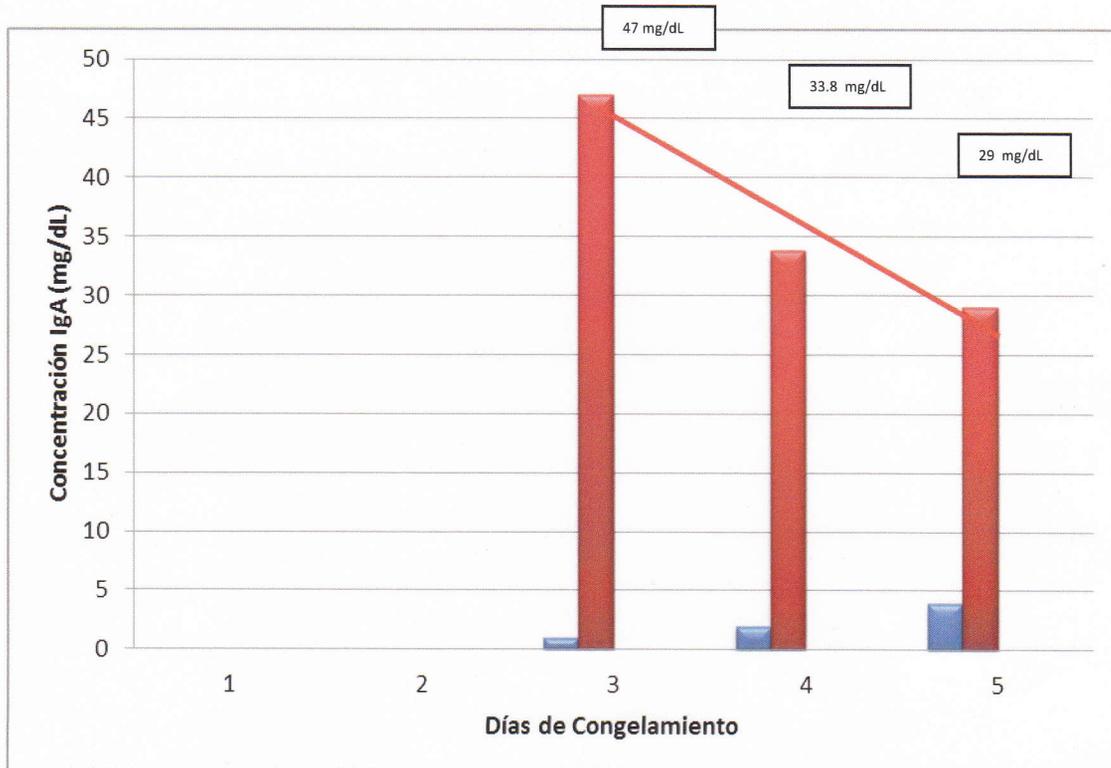
**Tabla No.4 Concentraciones de IgA respecto a los días de congelación**

Muestras congeladas	Días de Congelado I	Concentración promedio de IgA (mg/dL)
06	1	47
11	2	33.8
03	4	29
Total	20	

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el banco de leche humana del Hospital Nacional "Pedro de Bethancourt" y laboratorio de inmunología del Hospital Roosevelt

En la gráfica No.1 se observa el comportamiento de las concentraciones de inmunoglobulina respecto a los días de congelamiento, en donde a mayor tiempo de congelación menor concentración de inmunoglobulina A.

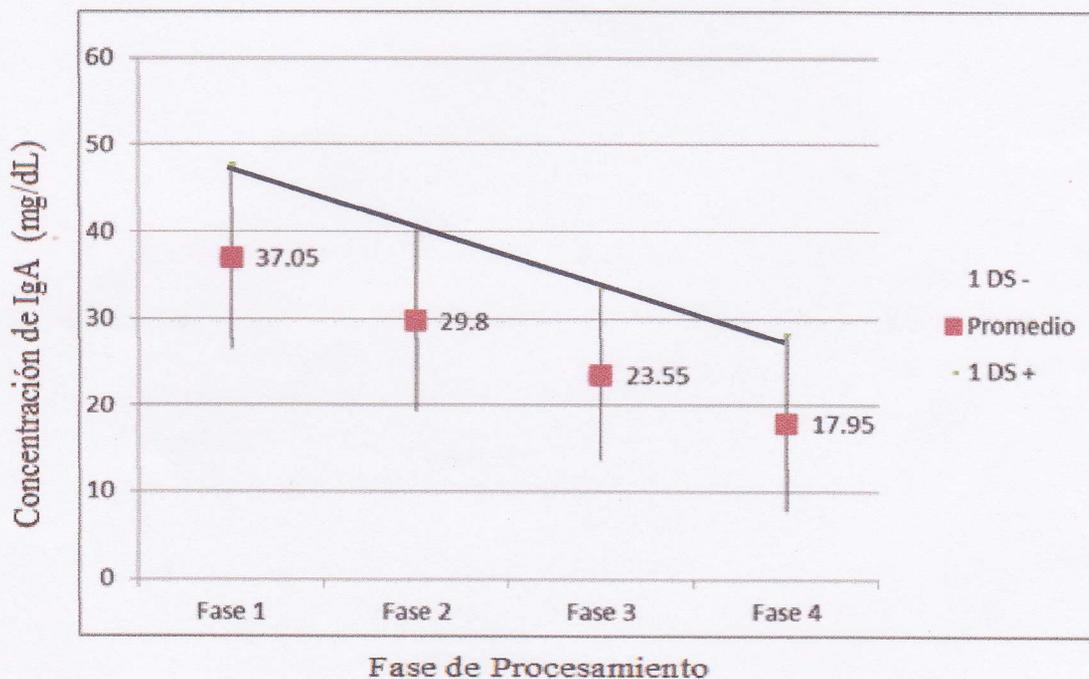
**Gráfica No.1 Concentraciones de IgA respecto a los días de congelamiento**



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el banco de leche humana del Hospital Nacional "Pedro de Bethancourt" y laboratorio de inmunología del Hospital Roosevelt

La gráfica No.2 muestra las concentraciones promedio de inmunoglobulina A en cada una de las fases de procesamiento de la leche materna.

**Gráfica No.2 Concentraciones de Inmunoglobulina A promedio por fase de procesamiento**



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el banco de leche humana del Hospital Nacional "Pedro de Bethancourt" y laboratorio de inmunología del Hospital Roosevelt

Fase I: fase de extracción, fase II: descongelación I, fase III: pasteurización, fase IV: descongelación II

Los resultados indican que las concentraciones promedio de IgA disminuyeron en cada fase del procesamiento; fase I 37.05mg/dL, fase II 29.8mg/dL, fase III 23.55 y fase IV 17.95 mg/dL, demostrando que existió diferencia significativa en cada una de las fases del procesamiento de la leche materna.

## IX. Discusión de resultados

Los bancos de leche humana como centros especializados realizan una serie de procedimientos en la leche materna, en donde las concentraciones de proteínas tales como la inmunoglobulina A se ven disminuidas (Soto, 2009).

En el presente estudio se determinaron las concentraciones de inmunoglobulina A (IgA) durante los procesos que se realizan en el banco de leche humana. En la tabla No.1 se presentan los datos obtenidos en la evaluación de concentración promedio de IgA, contenido calórico y acidez Dornic, observándose que las muestras que presentaban mayor concentración de inmunoglobulina, tenían menor contenido calórico y mayor acidez Dornic, por el contrario las muestras con menor concentración de IgA, presentaron una acidez elevada y mayores contenidos calóricos.

La leche está compuesta por tres fracciones; emulsión, suspensión y solución. La emulsión posee componentes liposolubles como grasa empaquetada; la suspensión es principalmente conglomerado protéico y la solución está formada por constituyentes hidrosolubles, como IgA. Las leches que presentan mayor fracción suspensión o solución contienen elevada concentración de inmunoglobulina y bajo contenido calórico; por el contrario a mayor fracción emulsión, alto contenido calórico y menor concentración de inmunoglobulina. Con respecto a la acidez, el aumento del título de acidez Dornic se debe al consumo de la lactosa por la microbiota de la leche, formando ácido láctico, el cual afecta la estabilidad de la IgA destruyéndola, es por ello que a mayor microorganismos, mayor acidez, que destruye la proteína (APP, 2005) (Moreira, 2011).

En un estudio llevado a cabo por Novak y Cordeiro se demostró una correlación positiva entre el título de acidez Dornic y la concentración de microorganismos en las leches analizadas, esto concluyó que la concentración de IgA se ve disminuida conforme a la carga bacteriana en la leche humana, lo cual concuerda con el presente estudio al demostrarse que a mayor acidez Dornic menor concentración de IgA (Novak & Cordeiro, 2007).

La tabla 2 muestra como disminuye la concentración de inmunoglobulina en cada fase del procesamiento. En la fase I la muestra no ha sufrido ningún proceso ya que únicamente ha sido extraída de la madre, encontrándose al 100%, con concentración promedio de 37.05 mg/dL, mínima de 20 y máxima de 59 mg/dL de IgA, en la fase II se encuentra 80.40%, las concentraciones tienen un rango mínimo de 12 y máximo de 54, con promedio de 29.80 mg/dL. Está es la fase en la que se observó que la concentración de IgA disminuye en mayor porcentaje (19.60%), debido a que el refrigerador en donde se realiza no mantiene una temperatura constante de -5 a -10°C sugerida por las guías del Human Milk Banking, ya que abren y cierran frecuentemente la puerta del congelador en donde están almacenadas las muestras, lo que ocasiona la formación de cristales grandes que rompen proteínas y que permiten el crecimiento bacteriano haciendo que la inmunoglobulina se destruya.

En la fase III se encuentra 63.6% de concentración de IgA, con mínima de 7 y máxima de 49 mg/dL. El proceso de pasteurización se realiza con el fin de disminuir la carga bacteriana y viral, sin embargo la elevación de la temperatura a 62.5°C por tiempos de 30 minutos hace que se desnaturalicen proteínas, provocando su destrucción y reduciendo la concentración de inmunoglobulina. Se ha demostrado en estudios realizados en bancos de leche de Estados Unidos que pertenecen a la Human Milk Banking Association, que la pasteurización realizada bajo estos parámetros de temperatura y tiempo, es el mejor proceso para eliminar el 99.9% de patógenos, entre ellos los virus como HIV, CMV y otros virus causantes de enfermedades, que son eliminados a temperaturas mayores de 56°C y conserva cerca del 40 al 50% de proteína (APP, Pittard, 2011).

En la fase de pasteurización, la media de inmunoglobulina A fue de 23.55 mg/dL, que es similar a la reportada en un estudio realizado por Hartmann, en donde obtuvo 26.33 mg/dL utilizando un método de turbidimetría para el análisis de IgA al igual que el presente estudio (Hartmann, 2006).

Durante la fase IV la concentración promedio fue 17.95mg/dL, con concentraciones de 1 hasta 41 mg/dL, esta fase consistió en descongelación II, en donde las concentraciones de inmunoglobulina se disminuyeron a 48.5%, sin embargo el porcentaje que se reduce es menor a la primera descongelación probablemente porque estos refrigeradores no se abren

constantemente como los primeros, por lo que las temperaturas de  $-18$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  se mantienen constantes impidiendo la formación de cristales de hielo o que estos sean tan mínimos que no destruyen la proteína, además la leche se encuentra pasteurizada por lo que no existen bacterias que puedan consumir la proteína (Moreira, 2011).

En algunas muestras las concentraciones de IgA disminuyeron más del 90% al finalizar las cuatro fases del procesamiento, en la fase I se encontró una máxima de 59 y mínima de 20 mg/dL, que en la última fase del proceso, fase IV llegan a 41 y hasta 1 mg/dL, perdiendo alrededor del 95% de inmunoglobulina. Esto pudo deberse a que permanecieron por más días luego de su recolección en el congelador que no mantiene una temperatura estable provocando una destrucción de proteína por cristales y presencia de bacterias en la leche.

La contaminación bacteriana de la leche puede deberse a un mal lavado de pechos y mal manejo de extractores u otras fuentes de contaminación en el proceso de extracción, provocando que la carga bacteriana consuma la proteína afectando las concentraciones de inmunoglobulina. Se debe considerar que las muestras que tenían baja concentración de IgA en fase I, pueden haber sido provenientes de madres con varios días post-parto, mala alimentación, extremos de edad, entre otras variables que no fueron consideradas en el estudio ya que no son tomadas en cuenta en los bancos de leche para la recolección de muestras (Rodríguez, 2008).

Además se estableció la diferencia que existe entre cada una de las fases con respecto al efecto que producen en las concentraciones de inmunoglobulina. En la tabla No.3, se muestra una disminución significativa entre las distintas fases de procesamiento de la leche materna, al pasar de la fase I a la II redujeron 7.25 mg/dL la concentración de IgA, debido al proceso de congelamiento en donde se dañan proteína por formación de cristales y la carga bacteriana que aumenta la acidez, de la fase II a la III disminuyó 6.25 mg/dL por la desnaturalización protéica en la pasteurización, y de fase III a fase IV sufrieron una segunda congelación en donde pierde 5.6 mg/dL, debido a los cristales de hielo que destruyen la IgA (Pittard, 2011).

Se realizó un análisis de la concentración de IgA en las muestras de leche según los días en que fueron congeladas luego de su recolección. Como se observa en la tabla No.4, las muestras que tuvieron mayor días de congelamiento presentaron menor concentración de IgA, la disminución de la concentración de inmunoglobulina se puede observar en la grafica No.1. El congelamiento a temperaturas poco estables y en donde no existe control de ellas, permite la formación de cristales grandes y puntiagudos que son capaces de romper grasas y proteínas, además que al sobrepasar las 24 horas de congelamiento las acciones enzimáticas y de microorganismos llegan a disminuir las concentraciones de proteínas como la inmunoglobulina A provocando reacciones indeseables en el producto, como la desnaturalización y pérdida de proteína (Gil, 2010).

En la gráfica no.2 los promedios de las concentraciones de las 20 muestras de leche materna analizadas disminuyen en cada una de las fases, debido a que las proteínas sufrieron daños por temperatura de congelación y pasteurización, así como también por carga bacteriana, haciendo que en cada proceso la concentración de inmunoglobulina disminuyera, tal como se muestra en la gráfica, en donde existe una tendencia descendente debido a que en cada fase disminuye la concentración de IgA.

La leche pasteurizada, proveniente de los bancos de leche humana, es procesada con el fin de garantizar que no contenga patógenos que puedan ocasionar enfermedades y que los nutrientes de la leche materna lleguen a fortalecer el sistema inmunológico del neonato.

Durante el estudio realizado se observó que cada fase a la que fueron sometidas las muestras de leche disminuyeron las concentraciones de IgA, en la fase II se tiene el 80.4%, fase III 63.6% y fase IV 48.5% de inmunoglobulina A, siendo la fase II y III los principales puntos críticos del proceso. En la fase II se perdió 19.6% de inmunoglobulina, siendo el principal punto crítico, debido a los cristales formados y carga bacteriana que dañaron la proteína por el mal control de temperaturas. En fase III, bajó un 16.8% a causa de la desnaturalización de proteínas por las temperaturas elevadas a las que se lleva a cabo la pasteurización, reduciendo las concentraciones de la inmunoglobulina.

Las limitantes del estudio fueron que no se relacionaron las muestras con los días post-parto, edad y estado nutricional de las madres donadoras. En estudios como el de Humbert y colaboradores se clasificaron las muestras de leche según los días post-parto y edad de las madres, demostrando que a mayor días post-parto la leche contenía mayor concentración de IgA, sin embargo en el estudio de Humbert la edad no influyó en las concentraciones de inmunoglobulina (Humbert, 2006).

La posibilidad de tomar en cuenta factores tales como estado nutricional, edad, días post-parto; nuevos métodos de congelamiento a menor días y a temperaturas estables, entre otros, permitirá a futuras investigaciones evaluar de una manera efectiva la relación de las concentraciones de IgA con estos y otros factores presentes en la madre. Además de evaluar metodologías que ayuden en la conservación de la inmunoglobulina durante los congelamientos y demás procesos a los que se somete en un banco de leche, para poder brindar un mejor producto final con mayores concentraciones de nutrientes y componentes inmunológicos como la IgA, a neonatos que por sus condiciones de salud requieren de este alimento.

## X. Conclusiones

1. Las concentraciones promedio de IgA al iniciar cada una de las fases a las que se somete en el banco de leche humana son: descongelación I 37.05 mg/dL (100%), pasteurización 29.8 mg/dL (80.4%) y en descongelación II 23.55 mg/dL (63.6%) observándose que las concentraciones de las muestras analizadas fueron disminuyendo durante cada una de las fases de procesamiento.
2. Las concentraciones de IgA observadas al finalizar las fases del proceso de la leche materna fueron: descongelación I 29.8 mg/dL (80.4%), pasteurización 23.55 mg/dL (63.6%) y descongelación II 17.95 mg/dL (48.5%). Lo que significa que existe una diferencia entre las concentraciones de IgA en cada fase del procesamiento, debido a formación de cristales y desnaturalización proteica.
3. La leche procedente del banco de leche humana, antes de la administración al neonato contiene 48.5% de la concentración original de inmunoglobulina, esta reducción de 51.5% del total de IgA es debida a los procesos sometidos en el banco de leche, sin embargo continua siendo un aporte inmunológico importante para el lactante.
4. La fase de descongelación I fue la que más afectó las concentraciones de IgA, disminuyéndola un 19.6% de la concentración inicial, resultando un punto critico en el procesamiento del banco de leche debido a la inestabilidad de las temperaturas de congelación y formación de cristales que destruyen la proteína.

## **XI. Recomendaciones**

1. Evaluar el efecto de los días de congelamiento de la leche materna sobre las concentraciones de inmunoglobulina A en las muestras tomando como base los datos proporcionados en el presente estudio.
2. Promover nuevos estudios en métodos de congelación que ayuden a reducir la pérdida de contenido de inmunoglobulina A durante las fases de congelación en el proceso del banco de leche.
3. Realizar una evaluación del aporte inmunológico de la leche materna donada, determinando comparaciones de concentración de inmunoglobulina, según los días post-parto de la madre.
4. Elaborar ensayos con nuevas técnicas en el procesamiento de la leche materna, basados en la búsqueda de brindar una leche con mayor aporte inmunológico.

## XII. Referencias

1. Achurra, X, Alvear J, Atalah, E, Becerra, C, Castillo, C, et al.(2010). *Lactancia*. Santiago de Chile: Editorial Universitario. 405 pp.
2. Aguilar, M. (2000). Barreras para la lactancia exclusiva durante los primeros seis meses de edad en niños de una población rural en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala. 35 pp.
3. Amanzo, C. (2010). *Lactancia Materna*. Pediátrico. Clínicas Pediátricas de Norteamérica. Estados Unidos. 606-608 pp.
4. Avery, C, Fletcher, M, MacDonald, M. (2001). *Neonatología, fisiología y manejo del recién nacido* (5ta ed.). Argentina: Médica Panamericana.
5. Ayela, Ma. (2009). *Lactancia Materna*. España: Editorial Club Universitario. 3037 pp.
6. Behrman, Kliegman, Jenson. (2005). *Tratado de Pediatría* (17va ed.). Madrid, España: Nelson. 741-750 pp.
7. Díaz, V. (2003). Lactancia Materna: evaluación nutricional en el recién nacido. *Revista Cubana Pediatría*, 77, 74-77 pp.
8. Díaz, V. (2008). *Guía Práctica de Nutrición Infantil*. Madrid, España: Editorial Gamma. 1056-1058 pp
9. Fustiñana, Mariani, Jenik, Lupo. (2009). *Neonatología Práctica* (4ta ed.). Argentina: Editorial Médica Panamericana. 444-465 pp.

10. García, M, Renovell, C (2008). *Protocolo de Nutrición en el Recién Nacido*. España: Enfermeras de la 7 ma. de Pediatría del Hospital Clínico de Valencia 108, 110 pp.
11. Gil, L. (2003). Anticuerpos IgA en la leche humana: relación con enfermedad diarreica en el niño. Guatemala: Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala. 35 pp.
12. Gil, A. (2010). *Tratado de Nutrición. Tomo II Nutrición Humana en el Estado de Salud* (2da ed.). Colombia: Editorial Médica Panamericana. 990 pp.
13. Hanson LA. (1999). *Human milk and host defence: immediate and long-term effects*. Estados Unidos: Editorial Asociativo AIEC. 903, 909 pp.
14. Hartmann S, Wigdahl, B, Neely, et al. (2006). *Biochemical Analysis of Human Milk Treated With Sodium Dodecyl Sulfate, an Alkyl Sulfate Microbicide That Inactivates Human Immunodeficiency Virus Type 1. Journal of Human Lactation*. Estados Unidos: Human lactation. 77, 85 pp.
15. Holanada, B, (2004). *Activación de la Inteligencia*. Colombia: Editorial DeCopy. 56-61 pp.
16. Humbert, G., Guingamp, M., et al. (2006). *The Clarifying Reagent, or how to make the analysis of milk and dairy products easier. Journal of Dairy Research*, Estados Unidos: Human lactation
17. Ibañez, R. (2008). *Manual de Lactancia Materna De la teoría a la práctica*. Madrid, España: Médica Panamericana. 1030 pp.
18. Lanceld, B, (2003). Principios de Orientación para la Alimentación Complementaria del Niño Amamantado. Recuperado de: [http://whqlibdoc.who.int/paho/2003/9275324603\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/paho/2003/9275324603_spa.pdf)

19. Manchet, R., Carbonell, A., Sarmiento, M., et al. (2010). *Purification of secretory immunoglobulin A from human colostrum*. Canada: School of Health Sciences, University.
20. Manrique, M. (2008). Situación de la Primera Infancia en Guatemala. Recuperado de: [http://www.unicef.org.gt/1\\_recursos\\_unicefgua/publicaciones/situacion\\_dela\\_primera\\_infancia.pdf](http://www.unicef.org.gt/1_recursos_unicefgua/publicaciones/situacion_dela_primera_infancia.pdf)
21. Moreira, R. (2011). *Curso, procesamiento y "control de calidad de la leche humana"* (1ra ed.). Guatemala. Editorial Figueira. 19-24, 60-64 pp.
22. Organización Mundial de la Salud. (2010). Lactancia materna. Recuperado de: [http://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/topics/newborn/nutrition/breastfeeding/es/](http://www.who.int/maternal_child_adolescent/topics/newborn/nutrition/breastfeeding/es/)
23. Organización Mundial de la Salud. (2010). Bancos de Leche. Recuperado de: [http://www.brasil.gov.br/sobre/salud/programas-y-campanas/bancos-de-leche-1/br\\_video?set\\_language=es](http://www.brasil.gov.br/sobre/salud/programas-y-campanas/bancos-de-leche-1/br_video?set_language=es)
24. Pittard, W, Bill, K. (2011). Effect of Refrigeration on Cellular Components. *Journal of de Human Milk Banking*. 44106, 89-104 pp.
25. Raspini, M, Stabile, V, Dirr, A Di Iorio, A. (2010). *Alimentación del Niño Sano* (4ta ed.). Argentina:Editorial Universitario del Mar Plata. 67-81pp.
26. Rodríguez, V, Magro, E. (2,008). *Bases de la Alimentación Humana*. España: Editorial Gesbiblo. 900, 1020 pp.
27. Rodríguez, M. (2001). *Alimentación Infantil* (3ra ed.). Madrid, España: Editorial Díaz de Santos. 879-885 pp.

28. Rodríguez, U, Mejía, A. (2009). *Guías de Pediatría Práctica basadas en la evidencia* (2da ed.). Colombia: Editorial Médica Panamericana. 123-132 pp.
29. Rojas, C, Guerrero, R. (1999). *Nutrición Clínica y Gastroenterología Pediátrica*. Colombia: Editorial Médica Panamericana. 307-313 pp.
30. Solares, M, (2010). Bancos de Leche Humana. Recuperado de: <http://www.saluddealtura.com/todopublicosalud/saludnutricionfamilia/nutricion/alimentacion-primeros-dos-anos/banco-leche-humana/>
31. Schanler RJ, Hurst NM, (2005) The use of human milk and breastfeeding in premature infants. Estados Unidos: Editorial Clin Perinatol. 26: 379-98 pp.
32. Mendez R, (2009). *Nutrición Pediátrica* (3ra ed.). Venezuela: Editorial Médica Panamericana. 405-407, 533 pp.
33. Novak, F. R. & Cordeiro, D. M. (2007). The correlation between aerobic mesophilic microorganism counts and Dornic acidity in expressed human breastmilk. *Jornal de Pediatría*, 83(1), 87-91.
34. Soto, M.A. y Moreira, R. (2007) *Manual Técnico y Funciones del Banco de Leche Materna, Hospital Nacional Pedro de Bethancourt*. Guatemala: s.n. 1-15 pp.
35. Xanthou M, Bines J, Walker WA. (2005). *Human milk and intestinal host defences in newborns*. Estados Unidos: Editorial Pediátrico.43-44, 51 pp.
36. Xanthou M. (2008). *Immune protection of human milk*. Estados Unidos: Editorial Pediátrico.75-80 pp.

37. Wilson CB, Lewis DB, Penix LA (2006). *The physiologic immunodeficiency of immaturity*. Estados Unidos: Immunologic disorders of infants and children. 7, 77 pp.
38. Winter, W, Garrido, A, Pérez, H, Ramírez, L, Toledo, A. (2011). Buenas prácticas de manufactura, análisis de peligros y puntos críticos de control en los bancos de leche materna exclusiva en hospitales nacionales de Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala. 40 pp.

### XIII. Anexos

Anexo 1: Flujoograma del procesamiento de leche en el banco de leche materna del Hospital Nacional "Pedro de Bethancourt"



Fuente:

Fotografías obtenidas del Banco de Leche Humana del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt, Antigua Guatemala, 2012.

**Anexo 2: Fórmulas para determinar el porcentaje de crema y contenido calórico (Kcal) de muestra de leche extraída**

<b>Dato</b>	<b>Fórmula</b>
Porcentaje de crema	Crema (mm) X 100 / total (mm)
Porcentaje de grasa	% de crema x 0.59 / 1.46
Calorías por litro	(% crema X 66.8) + 290.

Fuente: Manual Técnico y Funciones del Banco de Leche Materna, Hospital Nacional Pedro de Bethancourt. Soto, M.A. y Moreira, R. (2007) Guatemala: s.n.

**Anexo 3: Concentraciones de inmunoglobulinas conforme al día de secreción de leche materna**

<b>Día</b>	<b>IgA (mg/ml)</b>	<b>IgG(mg/ml)</b>	<b>IgM(mg/ml)</b>
1	600	80	125
2	260	45	65
3	200	35	58
4	80	16	30

Fuente: Nutrición Clínica y Gastroenterología Pediátrica. Rojas, C, Guerrero, R. (1999). Colombia: Médica Panamericana

María Stephanie Lissette Linares Saucedo  
Autora

MSc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán.  
Asesor

Licda. Renata Moreira Ramirez  
Coasesora

MA. Ana Margarita Paz  
Revisora

MSc. Blanca Samayoa Herrera  
Revisora

MA. Maria Eugenia Paredes  
Directora de Escuela

Ph. D. Oscar Cobar Pinto  
Decano