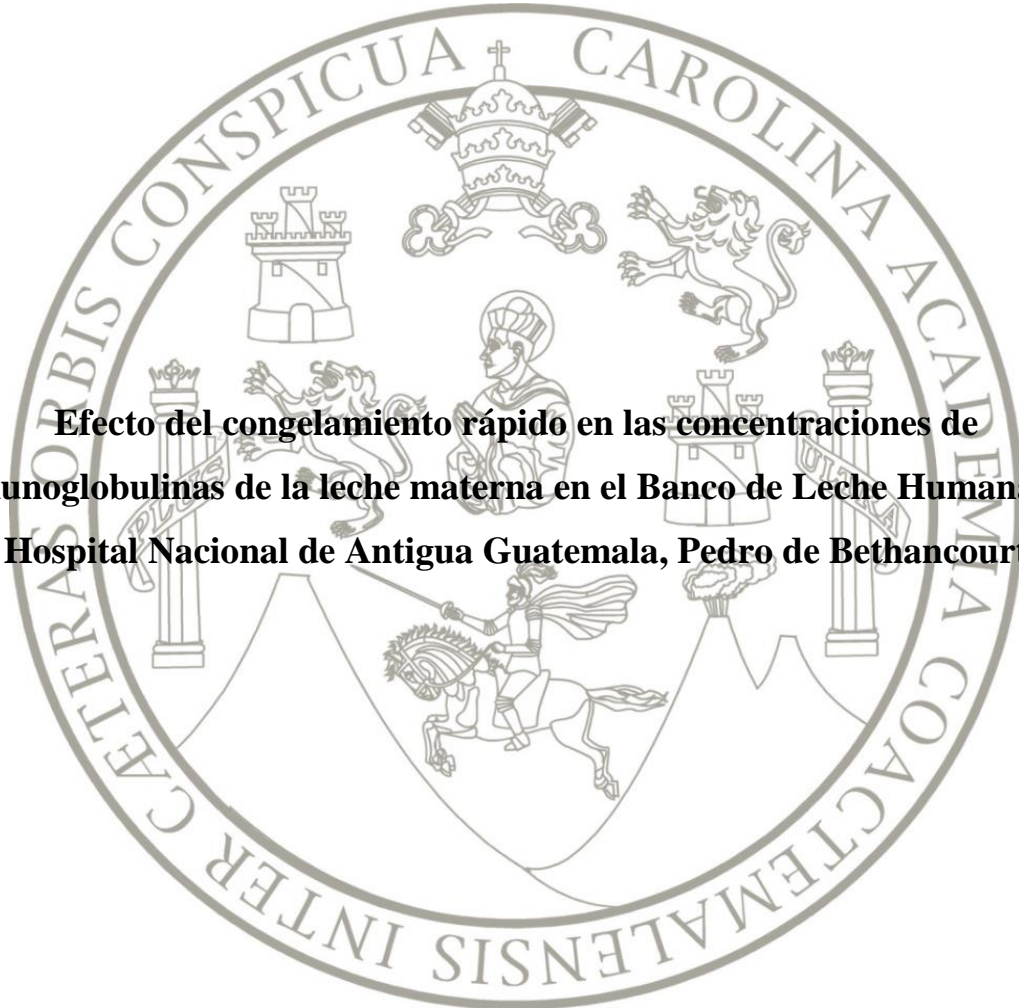


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**Efecto del congelamiento rápido en las concentraciones de
inmunoglobulinas de la leche materna en el Banco de Leche Humana del
Hospital Nacional de Antigua Guatemala, Pedro de Bethancourt**


Diana Karina BaldizónPernillo

Mirna Paola Morales Gutiérrez

QUÍMICAS BIÓLOGAS

Guatemala, Abril 2015

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



**Efecto del congelamiento rápido en las concentraciones de
inmunoglobulinas de la leche materna en el Banco de Leche Humana del
Hospital Nacional de Antigua Guatemala, Pedro de Bethancourt**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

Diana Karina Baldizón Pernillo

Mirna Paola Morales Gutiérrez

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICAS BIÓLOGAS**

Guatemala, Abril 2015

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Lic. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Br. Michael Javier Mó Leal	Vocal IV
Br. Blanqui Eunice Flores De León	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

- A DIOS: Por darnos la vida y acompañarnos en todo momento, guiándonos en todo momento, dándonos la fortaleza y perseverancia para alcanzar esta meta.
- A NUESTROS PADRES: Douglas, Eva, Eric y Mirna, por su infinito amor e incondicional apoyo, especialmente en los momentos difíciles.
- A NUESTRAS FAMILIAS: Hermanos, primos, sobrinos, tíos, abuelos por apoyarnos y darnos ánimos.
- A NUESTROS AMIGOS: Por las experiencias y gratos momentos que compartimos durante la carrera.
- A: La Universidad de San Carlos de Guatemala, la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y la Escuela de Química Biológica, especialmente a nuestro asesor, MSc. Gerardo Arroyo y nuestro revisor Lic. Claudio Gálvez por su apoyo y orientación.
- A: El hospital Roosevelt y hospital Pedro de Bethancourt, en especial al laboratorio de Reumatología y Banco de Leche Humana, respectivamente por su apoyo en el desarrollo de la investigación.

ÍNDICE

Contenido	Página
I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	1
A. Título del proyecto del estudiante	2
B. Asesor.....	2
C. Unidad académica responsable	2
D. Financiamiento	2
II. RESUMEN	3
III. ANTECEDENTES	4
A. Leche Humana.....	4
B. Componentes de la Leche Humana	4
1. Componentes nitrogenados	4
2. Minerales.....	4
3. Vitaminas	5
C. Tipos de Leche Materna.....	5
1. Calostro:	5
2. Transicional.....	6
3. Madura:	6
D. Lactancia Materna.....	6
E. Bancos de Leche Humana.....	7
1. Selección de la leche donada.....	9
2. Recolección de la leche	9
3. Procesamiento	10
F. Estudios previos de los componentes proteicos en leche	10
G. Métodos de congelamiento rápido	11
IV. JUSTIFICACIÓN.....	14
V. OBJETIVOS	16
A. General	16
B. Específicos	16
VI. HIPÓTESIS.....	17
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
A. Universo	18

B. Muestra.....	18
C. Recursos	19
D. Materiales y Equipo	19
E. Análisis Estadístico	24
VIII. RESULTADOS	25
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32
X. CONCLUSIONES	35
XI. RECOMENDACIONES	36
XII. REFERENCIAS	37
XIII. ANEXOS	40

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

La leche materna es el mejor alimento para el recién nacido por sus importantes aportes nutricionales e inmunológicos. Idealmente la lactancia debería realizarse durante al menos el primer año de vida del recién nacido (León-Cava, Lutter, Ross, & Martin, 2002). Sin embargo, existen circunstancias en las que no es posible que el niño reciba lactancia de la madre, debido a que las madres trabajan, se encuentran enfermas, no producen suficiente leche o fallecen, por estas razones a nivel mundial se están desarrollando estrategias para aumentar la disponibilidad de leche, una de ellas son los bancos de almacenamiento de leche humana (Maury, Sequera, Sánchez, Bravo, Romero, & Vizcarra, 2010).

La leche humana es sometida a diversos análisis tanto microbiológicos como fisicoquímicos, para asegurar la calidad de sus componentes. Se han identificado más de 30 componentes, a través de electroforesis, cromatografía y radioinmunoensayos, de los cuales 18 están asociados con proteínas en el suero materno y los otros se han hallado exclusivamente en la leche materna. La mayor concentración de inmunoglobulinas se encuentra en el calostro y va decreciendo en la medida que transcurre el tiempo de lactancia. En ella se encuentran todas las clases de inmunoglobulinas, de las cuales la IgA se encuentra en mayor proporción (Vázquez, Alonso, Medina, Bustos, Martínez & Pallás, 2009), constituyendo el 90% de todas las inmunoglobulinas presentes en el calostro y la leche. Su importancia no sólo radica en su concentración, sino también en su actividad biológica (Corteguera, 1998), siendo la IgA secretora (IgAs), la cual parece ser sintetizada en las células alveolares de la glándula mamaria, la que mayor trascendencia presenta de las inmunoglobulinas existentes. En el calostro la IgAs alcanza niveles de 300 mg/mL siendo éste su pico de mayor concentración y disminuye entre la segunda y tercer semana, permaneciendo constante en la leche materna (Sabillon & Abdu, 1997).

Debido a los procesos de enfriamiento, pasteurización y congelamiento a los que es sometida, la leche pierde aproximadamente un 50% de sus componentes nutricionales e inmunológicos (Maury, *et al.* 2010) que son especialmente importantes para los bebés

prematuros que necesitan ganar peso y fortalecer su sistema inmunológico. Como objetivo de este estudio, se demostró cuál de los dos métodos de congelamiento rápido es más efectivo para el congelamiento de las muestras de leche (un método consistió en congelar la leche en una mezcla de alcohol etílico al 95% y hielo seco, y el otro método empleando una combinación de alcohol etílico al 95%, hielo y sal), con el fin de preservar en mayor cantidad la concentración de inmunoglobulinas, especialmente la IgA e IgM, presentes en la leche humana, en comparación con el congelamiento convencional, método actualmente utilizado en los Bancos de Leche Humana, en el cual se coloca la leche en un congelador a -20°C .

A. Título del proyecto de los estudiantes

Efecto del congelamiento rápido en las concentraciones de inmunoglobulinas de la leche materna en el Banco de Leche Materna del Hospital Nacional de Antigua Guatemala, Pedro de Bethancourt.

B. Asesor

Gerardo Arroyo, MSc.
Licda. Renata Moreira. (Co asesor)

C. Unidad académica responsable

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

D. Financiamiento

Seminaristas Diana Karina Baldizón Pernillo y Mirna Paola Morales Gutiérrez.

II. RESUMEN

La leche materna es el mejor alimento para el recién nacido por sus importantes aportes nutricionales e inmunológicos, sin embargo, debido a los procesos de enfriamiento, pasteurización y congelamiento a los que es sometida en el banco de leche, la leche pierde aproximadamente un 50% de sus componentes, que son especialmente importantes para los bebés prematuros que necesitan ganar peso y fortalecer su sistema inmunológico.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos métodos de congelamiento rápido de las muestras de leche (un método consistió en congelar la leche en una mezcla de alcohol etílico al 95% y hielo seco, y el otro método empleando una combinación de alcohol etílico al 95%, hielo y sal) , con el fin de preservar en mayor cantidad la concentración de inmunoglobulinas, especialmente la IgA e IgM, presentes en la leche humana, en comparación con el congelamiento convencional, método actualmente utilizado en los Bancos de Leche Humana, en el cual se coloca la leche en un congelador a -20°C .

Se realizó un plan piloto para la estandarización de las metodologías y evaluación de la resistencia de los frascos de vidrio a las temperaturas de congelamiento, el tiempo en el que la temperatura desciende tanto en la mezcla frigorífica, como la leche contenida en los frascos de vidrio y el método que obtuvo mayor rendimiento. Estandarizadas las metodologías se realizó el muestreo de 25 leches humanas donadas al Banco de Leche Humana del Hospital Nacional de Antigua Guatemala, Pedro de Bethancourt, tomando una alícuota al momento de ser recolectada la muestra y previo a dividir la muestra en partes iguales para someter la misma muestra a los dos métodos de congelamiento. La determinación de IgA e IgM se realizó mediante turbidimetría en el Laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt de Guatemala, obteniéndose un decremento en la concentración de IgA, de 6.9% con respecto al método convencional y de 8.3% con el método de congelamiento rápido. De igual manera se obtuvo un decremento del 9.04% y del 14.19%, respectivamente para la concentración de IgM, No se evidenció diferencia estadísticamente significativa entre ellos para ambos métodos mediante ANDEVA de dos vías con un 95% de confianza.

III. ANTECEDENTES

A. Leche Humana

La leche humana es considerada un alimento completo y suficiente para garantizar el crecimiento y desarrollo del bebé durante los primeros dos años de vida. Es un alimento que el recién nacido puede digerir y asimilar fácilmente, además contiene elementos nutritivos e inmunológicos que lo ayudan en su crecimiento y nutrición (Díaz-Argüelles, 2005).

B. Componentes de la Leche Humana

Los componentes de la leche humana varían tanto de una madre a otra y en cada mujer, en el transcurso del día e incluso en una misma mamada. La fracción más estable es la proteica y la de mayor variabilidad, la grasa. Esta composición es dinámica y obedece a mecanismos de regulación neuroendocrina, donde desempeñan un papel importante células, nutrientes y sustancias químicas (Macias, Rodriguez, & Ronayne, 2006).

1. Componentes nitrogenados

En la leche existen dos fracciones nitrogenadas, una correspondiente al nitrógeno proteico, que forma el 75 por ciento del nitrógeno total y otra de nitrógeno no proteico, que corresponde al restante 25 por ciento e incluye urea, creatinina, creatina, ácido úrico, aminoácidos libres y amoníaco y, en menores cantidades, poliaminas, hormonas, factores de crecimiento, nucleótidos cíclicos y oligosacáridos que contienen nitrógeno (Macias, et al. 2006).

2. Minerales

La concentración de minerales está adaptada a los requerimientos nutricionales y capacidad metabólica del niño. La leche materna presenta alta biodisponibilidad de minerales, en especial de calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc. Estos se encuentran

presentes principalmente ligados a las proteínas del suero, al citrato o a la membrana proteica del glóbulo de grasa. El aporte total de minerales es bajo, lo que favorece el funcionamiento renal del lactante (Macias, et al. 2006).

3. Vitaminas

La leche de una madre bien nutrida presenta cantidades suficientes de vitaminas para el crecimiento normal del bebé solo con la excepción de la vitamina K, por lo cual se le puede aplicar una dosis de prevención por vía intramuscular al nacer (Sabillon & Abdu, 1997). La vitamina A interviene en el proceso de la visión y es necesaria para el crecimiento normal, la reproducción, el desarrollo fetal y la respuesta inmunológica. Su concentración en la leche humana es variable, debido que depende de la ingesta materna (Macias, et al. 2006).

C. Tipos de Leche Materna

1. Calostro:

El calostro humano es un fluido espeso y amarillento debido a la alta concentración de beta carotenos que le confieren el color y el sodio le proporciona un sabor ligeramente salado (Shellhorn & Valdés, 1995). Contiene menor cantidad de lactosa, grasas y vitaminas liposolubles que la leche madura, y mayor cantidad de proteínas, vitaminas liposolubles, carotenos y minerales como sodio y zinc (Sabillon & Abdu, 1997). Posee además IgA secretora en elevadas concentraciones (300 mg/mL) (Corteguera, 1998). Su volumen puede variar entre 2 a 20 mL por toma en los 3 primeros días (Álvarez, et al, 2010).

El calostro es fundamental para los primeros días del bebé, debido a la alta cantidad de factores de defensa (inmunoglobulinas A, lactoferrina, linfocitos, macrófagos, etc.) que favorecen al sistema inmune del bebé, evitando la adherencia de microorganismo patógenos en el tubo digestivo (Díaz- Argüelles, 2005).

2. Transicional

Es la leche que se produce entre el calostro y la leche madura es decir entre el 7 y 15 día posparto. Se observa un aumento del volumen progresivo hasta llegar alrededor de 600- 700 mL/día entre el 8 y 15 día posparto, esto puede variar según la madre, su contenido varía ya que los niveles de proteínas, inmunoglobulinas y vitaminas liposolubles disminuyen, y aumentan la lactosa, grasas, vitaminas hidrosolubles, y el valor calórico total (Díaz- Argüelles, 2005).

3. Madura:

Se produce a continuación de la leche de transición. Se secreta en promedio alrededor de 700-900 mL/día durante los seis meses posteriores al parto para luego descender a 500 mL/día durante los seis meses siguientes. Los principales componentes de la leche materna son: proteínas, agua, lactosa, grasa, minerales y vitaminas. Su pH es de siete (neutro) y su aporte energético está entre 70 a 76 kcal /dL (100 mL ó 3.5 onzas) (Díaz- Argüelles, 2005).

D. Lactancia Materna

La leche posee factores inmunológicos capaces de proteger al niño de diversas enfermedades, como diarreas e infecciones en las vías respiratorias (Koenig, et.al., 2005). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que los niños sean alimentados exclusivamente con leche materna durante los primeros seis meses de vida y que de ser posible se continúe con el amamantamiento hasta llegar a dos años o más, complementando la alimentación del niño con elementos adecuados (Organización Mundial De La Salud, 2012).

La leche materna es rica en inmunoglobulinas (especialmente en el calostro) (Koenig, et.al., 2005); la principal es la inmunoglobulina A secretora (IgAs), con menores cantidades de IgA monomérica, IgG e IgM. Se sintetiza en la glándula mamaria y su función es la de formar anticuerpos capaces de unirse a virus y bacterias, impidiendo la penetración en la mucosa intestinal, lo que se logra gracias

a su resistencia a la proteólisis y su estabilidad a pH bajo (Álvarez, et al. 2010). Otra función muy importante de la IgAs es el bloqueo de la adhesión de patógenos al epitelio intestinal y la unión a sus toxinas (Macias, et al. 2006).

Los beneficios más importantes y más visibles de la lactancia materna consisten en la inmediata salud y supervivencia del lactante. Las tasas de diarrea, las infecciones de las vías respiratorias, la otitis media y otras infecciones, así como las defunciones causadas por estas enfermedades, son menores en niños amamantados que en los que no lo son. Durante los primeros seis meses de vida, las tasas de diarrea e infecciones de las vías respiratorias son menores entre lactantes amamantados en forma exclusiva que entre los amamantados en forma parcial (León-Cava, et al. 2002).

E. Bancos de Leche Humana

La donación de leche es una práctica que se ha realizado desde el inicio de la historia. Las madres que no querían o no podían amamantar a sus bebés buscaban madres nodrizas para que dieran la lactancia. En 1,909 se inauguró el primer banco de leche en Viena, después le siguieron Boston y Alemania en esa misma década. El siglo XX se caracterizó por representar una era de revolución social donde se replanteó el papel de la mujer en la sociedad. Por lo que muchas madres optaron por acortar el período de lactancia u obviarlo y utilizar la leche de fórmula. Aunque el objetivo de crear la leche de fórmula fue para brindarle a los recién nacidos un suplemento en su nutrición, no iguala los componentes nutricionales e inmunológicos que se reciben de la leche (Vázquez, et al. 2009).

La pandemia del VIH/SIDA causó el cierre de muchos bancos de leche, debido a que la madre infectada tiene el virus circulando en la sangre y puede pasar a la leche infectando al recién nacido. A pesar de esto, gracias a los avances científicos se ha logrado obtener una mayor sensibilidad en los procesos de tamizaje para el VIH en las donadoras seleccionadas en los bancos de leche (Covas, Alda, de Baeza, Ferrer & Fernández, 2000).

En un recién nacido las puertas de entrada para los virus son las mucosas nasofaríngeas y gastrointestinales. Una contaminación e infección puede ocurrir en cualquier momento de la alimentación siendo más frecuente en las primeras semanas, en especial en infecciones recientes por VIH (sobre todo en infecciones agudas) debido a una mayor cantidad de virus en el torrente sanguíneo y en los casos en que la madre tiene linfocitos CD4 disminuidos (AAP, 2005).

La carga viral es un importante determinante de riesgo de transmisión, siendo significativamente más elevada en el calostro que en la leche madura. En una madre VIH positivo está contraindicado que proporcione lactancia, sin embargo se encuentran casos excepcionales en los que el niño no tiene acceso a otra fuente de alimento, por lo que ésta debe ser sometida a un estricto proceso de pasteurización (AAP, 2003). El VIH no es el único virus que se puede transmitir a través de la leche materna; otros virus como el citomegalovirus, herpes simplex, rubéola, sarampión, virus linfotrópico humano (HTLV) y los virus de hepatitis, principalmente el virus de hepatitis B (VHB), pueden ser también transmitidos. Debido a esto se busca desarrollar técnicas similares a las utilizadas en los bancos de sangre para eliminar estos agentes por medio de filtros de luz UV (Tully, Jones, & Tully, 2001).

En la actualidad muchos bancos de leche han tomado como modelo las guías brasileñas de bancos de leche. La red de bancos de leche en Brasil es la que más leche procesa al año a nivel mundial (Ministério da Saúde, 2001). Una de las diversas ventajas de las guías brasileñas, es que introducen en sus procedimientos parámetros de calidad utilizados también en la industria alimentaria, por lo que no solo se aseguran de obtener un producto seguro, sino también que conserve todas sus características nutricionales, con el objetivo es fortalecer a los recién nacidos en las fases críticas de crecimiento (Vásquez, et al. 2009).

Los bancos de leche humana son centros especializados que se encargan de la selección de donantes, el procesamiento de la leche según estándares de calidad y seguridad, el almacenamiento y dispensación (Gormaz, et al. 2011). Es importante recalcar que entre sus funciones se encuentra promover la lactancia materna y educar a las mujeres para la adecuada higiene y formas de alimentación para los recién nacidos (Winter, Garrido, Pérez, Ramírez & Toledo, 2011).

1. Selección de la leche donada

En la Red de Bancos de Leche Brasileña, la selección de la leche apta para la pasteurización se realiza con base en la acidez de Dornic, la cual se correlaciona de forma directamente proporcional con la contaminación bacteriana. También se utiliza como un parámetro para evaluar la calidad de la leche. Una leche muy ácida es de pésima calidad, porque es más osmolar y tiene una menor biodisponibilidad del fósforo y el calcio. Adicionalmente se mide el crematocrito, que es la proporción de crema (parte de proteínas y de la grasa), con lo que se puede realizar un cálculo de calorías. Por tanto, la leche se clasifica con base a la acidez medida en grados Dornic y a su contenido calórico, por lo que de esta manera la leche se puede seleccionar de acuerdo a las diferentes necesidades de cada receptor (Vásquez, et al. 2009).

La pasteurización se lleva a cabo por el método de Holter y posteriormente se realiza un control microbiológico, sino es estéril no es apta para el consumo. No se admite como donadoras de leche a las madres que llevan más de un año lactando, debido a que con el paso del tiempo la composición de la leche cambia, disminuyendo su contenido calórico y ya no proporciona los elementos nutricionales necesarios (Novak, Junqueira, Dias & Almeida, 2008).

2. Recolección de la leche

Después de la selección de las donantes, la leche se puede extraer de forma mecánica (con bombas succionadoras) o manualmente. Al momento de recolectar la

leche se debe asegurar que los recipientes sean los adecuados y estén en perfectas condiciones de esterilidad, así como debidamente etiquetados. Una vez registrados deben almacenarse a -20°C (Vásquez, et al. 2009).

3. Procesamiento

“La leche que se va a pasteurizar se descongela en baño de María y se detiene la descongelación en el momento que queda un bloque central de hielo de aproximadamente 50 por ciento del volumen total de la leche, por lo que este proceso debe ser vigilado estrictamente. Una vez descongelada se debe oler inmediatamente, ya que debe conservar sus características organolépticas y olores a rancio o pescado son indicadores de que la leche se encuentra en mal estado y debe rechazarse. Posteriormente se determina la acidez de Dornic y se calculan las calorías. Si la leche posee una acidez mayor a 8 también debe descartarse” (Vásquez, et al. 2009).

“La leche obtenida de cada una de las donantes es dividida en alícuotas de 30, 60 y 120 mL y se pasteuriza por el método de Holter a $62,5^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. El posterior enfriamiento debe realizarse lo más pronto posible y así evitar la pérdida de sus importantes propiedades. Una vez finalizado el proceso se toma una última muestra para el cultivo microbiológico y se congela a -20°C . El cultivo debe ser estéril, pues de lo contrario la leche deberá ser rechazada” (Vásquez, et al. 2009).

“El período máximo de almacenamiento postpasteurización es de 3 meses, porque las inmunoglobulinas sufren un descenso paulatino entre mayor tiempo se conserven almacenadas” (Vásquez, et al. 2009).

F. Estudios previos de los componentes proteicos en leche

Diversos estudios muestran resultados variables respecto a los cambios en la composición proteica de la leche humana durante el almacenamiento a distintas temperaturas. Se ha documentado que puede ocurrir proteólisis durante la

refrigeración. No así durante el congelamiento, pues conserva características similares a la leche fresca (Weaver, Arthur, Bunn, & Thomas, 1998).

Cuando la leche es sometida a temperaturas inferiores a -0.55°C (punto de congelación) ocurre una reducción de la velocidad de las reacciones enzimáticas, además que ocurre una disminución de la actividad del agua, minimizando así su disponibilidad para el crecimiento bacteriano, porque forma cristales de hielo (Vásquez, et al. 2009).

Las distintas formas de almacenamiento y las diferentes fracciones de la leche también presentan cambios respecto a la composición de elementos nutricionales e inmunológicos (Lawrence, 1999). La leche almacenada a -20°C presenta muchas similitudes con la leche fresca, a diferencia de la leche almacenada en refrigeración (4°C) en la cual ocurre un descenso de estos elementos e incluso del pH. En las madres que tienen su parto antes de llegar a término (pretérmino) producen una leche alta en sodio y proteínas (Egash, 2010). La IgA y la lactoferrina también son abundantes en ella. Esta leche se convierte rápidamente en el calostro, que también es muy rico en macronutrientes y elementos inmunológicos. Después el calostro se convierte en la leche de transición y esta finalmente termina en lo que se conoce como la leche madura. El cambio de todas esas fracciones comienza en la primer semana de lactancia y finaliza en la octava semana (Covas, et al. 2008).

G. Métodos de congelamiento rápido

Los métodos de congelamiento se pueden clasificar según su funcionamiento, la forma de trabajar, y el sistema de transferencia de calor (Barrera, Santos, Alas, & Martínez, 2010).

1. Funcionamiento
 - a. Por cargas “batch”
 - b. Continuos “in line”

2. Según la forma de trabajar
 - a. Envasado
 - b. No envasado

3. Según el sistema de transferencia de calor
 - a. Aire
 - b. Contacto
 - c. Criogénico

Según el sistema de transferencia de calor, existen dos tipos de sistemas de congelación por contacto:

1. Contacto directo (aire o inmersión)
2. Contacto indirecto (por contacto de placas)

a. Contacto Directo

En el método de congelamiento por inmersión, el producto es sumergido en soluciones de bajas temperaturas y congelación criogénica en las que el dióxido de carbono o nitrógeno líquido se rocían directamente sobre el producto. La superficie exterior del producto puede alcanzar temperaturas muy bajas sumergiendo el alimento dentro de un refrigerante líquido (Barrera, et al., 2010).

b. Contacto Indirecto

En ese sistema de congelación el producto se encuentra separado del refrigerante por medio de una barrera, el envase que contiene el producto, durante todo el proceso de congelación (Barrera, et al., 2010).

Las dos técnicas más utilizadas según el sistema de transferencia de calor son: el método de hielo seco/alcohol etílico al 95% y el método de hielo/sal/alcohol etílico al 95%. Ambas son una combinación de las técnicas de congelamiento directas e indirectas (Barrera, et al., 2010).

Tanto el método de hielo seco/alcohol etílico al 95% y el método de hielo/sal/alcohol etílico al 95% son una combinación de las técnicas de congelamiento directas e indirectas respecto al sistema de transferencia de calor (Barrera, et al., 2010).

i. Método de hielo seco con alcohol etílico al 95%

El hielo seco posee una temperatura de sublimación de -78°C , lo cual lo convierte en un excelente refrigerante. Al combinar el hielo seco con el alcohol, el hielo seco permitirá mantener el sistema a baja temperatura y no dejará que se escapen los vapores del alcohol (Barrera, et al., 2010).

ii. Método de hielo con alcohol etílico al 95% y sal

El agua se congela a 0°C , al agregar sal, esta mezcla se congela a -2.2°C . Por lo que se obtiene que un descenso en la temperatura sin congelar la solución refrigerante (Barrera, et al., 2010).

Tanto el método de hielo seco con alcohol etílico al 95% y el método de hielo con alcohol etílico al 95% y sal son una combinación de las técnicas de congelamiento directas e indirectas respecto al sistema de transferencia de calor (Barrera, et al., 2010).

IV. JUSTIFICACIÓN

La lactancia materna es una de las etapas más importantes en el desarrollo del recién nacido, debido a que le proporciona los requerimientos necesarios para el desarrollo nutricional e inmunológico, además de fortalecer el nexo emocional entre la madre y el recién nacido (León-Cava, Lutter, Ross, & Martin, 2002). A pesar de sus múltiples ventajas, muchas madres no pueden dar lactancia porque tienen que trabajar, porque enferman, no producen suficiente leche o fallecen. Es por ello que los bancos de leche surgen como una buena alternativa y se encargan de seleccionar a las donantes, de la extracción de la leche, la refrigeración, la pasteurización, el control microbiológico, y el almacenamiento por congelación para su posterior distribución. Los bancos de leche no sólo se limitan a recolectar leche, sino que también se encargan de educar a la población, promoviendo la lactancia materna y las precauciones que las madres deben de tener en cuanto a higiene y cuidados al dar la lactancia. La mayor labor de los bancos de leche es en niños prematuros y de bajo peso al nacer, ya que es esencial alimentarlos con todos los beneficios y aportes que contiene la leche para que desarrollen adecuadamente su sistema inmunológico, nutricional y psicomotriz (Maury, et al, 2010).

La leche posee componentes nutricionales como proteínas, vitaminas y minerales y también lactoferrina, lisozimas e inmunoglobulinas que favorecen el desarrollo y crecimiento del neonato. Las inmunoglobulinas son anticuerpos transferidos de la madre al niño, las cuales desarrollan la primer defensa del sistema inmune del niño y lo ayudan a ser menos susceptible a diarreas y enfermedades virales. En estudios recientes, Maury y col. (2010) señalan que se ha demostrado que los procesos a los cuales es sometida la leche en los Bancos reducen hasta en un 50% las concentraciones de inmunoglobulinas y los demás componentes proteicos, por ello es necesaria la evaluación de un método de congelamiento rápido que ayude a preservar en mayor cantidad la concentración de inmunoglobulinas presentes en la leche humana.

El Banco de Leche del Hospital de Antigua Guatemala, Pedro de Bethancourt se inauguró en el año 2007, siendo el primer banco de leche a nivel centroamericano, el cual se ha

logrado posicionar dentro los primeros lugares, debido a que cuenta con la Normativa Técnica para el funcionamiento de Bancos de Leche Humana, la cual fue elaborada a partir del trabajo conjunto de técnicos de la Red Brasileña de Bancos de Leche Humana/Fundación Oswaldo Cruz/Ministerio de la Salud del Brasil y de profesionales del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de la República de Guatemala, en cumplimiento a lo dispuesto en el Ajuste Complementario al Acuerdo Básico de Cooperación Científica y Técnica entre el Gobierno de la República Federativa del Brasil y el Gobierno de la República de Guatemala para la implementación del Proyecto “Apoyo Técnico para implementación/Implementación de Bancos de Leche Humana en Guatemala” firmado el 04 de abril de 2008 (Guerra, da Silva, Novak & Sydronio, 2006).

Por estas razones, con este estudio se pretendió estandarizar un método de congelamiento rápido que permita conservar en mayor proporción los componentes de la leche, especialmente los anticuerpos que la madre le transfiere a su bebé, para que en los procesos posteriores a los que sea sometida la leche se logre conservar más del 50% de estos elementos importantes.

V. OBJETIVOS

A. General

Determinar el efecto del congelamiento rápido en las concentraciones de inmunoglobulinas A y M de la leche materna en el Banco de Leche Humana del Hospital Nacional de Antigua Guatemala.

B. Específicos

1. Establecer qué método de congelamiento es más rápido y efectivo para lograr conservar en mayor concentración los niveles de inmunoglobulinas A y M presentes en la leche humana.
2. Establecer costos, efectividad y tiempo de realización de dos métodos de congelamiento rápido, comparado con el método de congelamiento utilizado de rutina en el banco de leche.

VI. HIPÓTESIS

La utilización de los dos métodos de congelamiento rápido presenta variación estadísticamente significativa en las concentraciones de IgA e IgM, con el método de congelamiento utilizado actualmente en el banco de leche humana del Hospital Nacional de Antigua Guatemala, Pedro de Bethancourt.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación experimental consistió en una serie de ensayos que utilizan dos métodos alternativos de congelamiento rápido de leche materna, y comparan la capacidad de preservación de componentes termolábiles contra el método empleado actualmente en el Banco de Leche Humana del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt, Antigua Guatemala. Se determinó la concentración de IgA e IgM en leche humana antes y después de los procesos de congelamiento.

A. Universo

La población está constituida por la leche materna recién extraída de las donantes que asisten al Banco de Leche Humana del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt de Antigua Guatemala.

B. Muestra

Se procesaron 25 muestras de leche materna para determinar la concentración de dos clases de inmunoglobulinas (A y M). Se tomaron cinco alícuotas: tres de 3 mL y 2 de 75 mL por cada muestra. Una alícuota de 3 mL inicial se utilizó para determinar la concentración basal de IgA e IgM. Las dos alícuotas de 75 mL de cada muestra fueron sujetas cada una al proceso de congelamiento por medio de uno de los dos métodos de congelamiento: hielo seco con alcohol etílico al 95% y el método convencional, el cual consiste en congelar la leche a -20° C. Las dos alícuotas de 3 mL restantes se tomaron de estas últimas alícuotas sometidas a los métodos de congelamiento evaluados, para determinar la concentración de IgA e IgM en la leche materna.

C. Recursos

1. Recursos Humanos

- Investigadoras: Diana Karina Baldizón Pernillo y Mirna Paola Morales Gutiérrez
- Asesor: Gerardo Arroyo, MSc.
- Coasesor: Licenciada Renata Moreira

2. Recursos Institucionales

- Banco de Leche Humana del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt de Antigua Guatemala, en el Departamento de Sacatepéquez.
- Laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt de Guatemala.
- Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

D. Materiales y Equipo

1. Equipo

- Centrífuga 5810 R Eppendorf ®
- Baño de María marca EME equipment ABL-65®
- Analizador Biosystem A25
- Termómetros de alcohol (-10° C a 150° C)
- Termómetro de criotemperaturas (-80° C a 110° C)
- Congeladores (-18° C y -22° C)
- Pipeta automática de volumen variable, de 100-1000 µL Eppendorf ®

2. Reactivos

- Kit de reactivos Biosystem (Bio-Nuclear®) para la determinación de IgA e IgM mediante turbidimetría.
- Hielo seco (CO₂ en estado sólido)
- Hielo (H₂O en estado sólido)
- Sal (NaCl de cocina)
- Alcohol etílico al 95%

3. Cristalería

- Frascos de vidrio de 12 oz con tapadera de plástico.
- Tubos de ensayo de plástico estériles BD®

4. Materiales

- Bata.
- Guantes descartables.
- Mascarillas.
- Cofias.
- Puntas descartables (tips) para pipetas de volumen variable con capacidad de 100-1000 μ L Eppendorf ®
- Gradilla metálica para tubos de 5 mL
- Hielera de duroport (27cm de alto x 27.5cm de ancho x 37cm de largo)

A. Metodología

Para la realización de este estudio se desarrolló un plan piloto para evaluar el tiempo, eficacia del congelamiento y la resistencia de los frascos de vidrio utilizados en el proceso de congelamiento. Los métodos de congelamiento rápido que se evaluaron consistieron en la combinación de hielo seco/alcohol etílico al 95%; y la combinación de hielo/sal/alcohol etílico al 95%. El método de congelamiento convencional, que se utiliza de rutina en los bancos de leche, se utilizó como método de referencia para la evaluación. Después de haber realizado el plan piloto y la evaluación de los resultados, se procedió a llevar a cabo la fase experimental de evaluación de métodos de congelamiento de leche materna.

1. Métodos de congelamiento

En el plan piloto se evaluaron tres métodos de congelamiento:

a. Método de congelamiento convencional

Se utiliza un congelador industrial de temperatura constante a -18°C , dentro del cual se colocan los frascos conteniendo la leche materna recién extraída,

la cual se congela homogéneamente en un tiempo aproximado de 120 minutos.

b. Método de congelamiento rápido con hielo seco/alcohol etílico al 95%

En una bandeja de acero inoxidable se colocaron cuatro litros de alcohol etílico al 95% con dos libras de hielo seco (CO_2 sólido). Se introduce un frasco de vidrio que contenía la muestra de leche dentro de la bandeja con la matriz de hielo seco y alcohol, la cual se encuentra a una temperatura menor a $-60\text{ }^\circ\text{C}$.

c. Método de congelamiento rápido con hielo/sal/alcohol etílico al 95%

En una bandeja de acero inoxidable se colocaron cuatro litros de alcohol etílico al 95% con dos libras de hielo (H_2O sólido) y dos libras de sal (NaCl). Se introduce un frasco de vidrio que contenía la muestra de leche dentro de la bandeja con la matriz de hielo, sal y alcohol, la cual se encuentra a una temperatura menor a $-3\text{ }^\circ\text{C}$ (ver gráfica No. 3).

2. Realización del plan piloto.

a. Se transportó 10 libras de hielo seco en una hielera de duroport y los demás materiales (dos litros de leche fluida comercial, 8 litros de alcohol etílico al 95%, una libra de sal y 10 libras de hielo, al laboratorio del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

b. Se utilizaron nueve frascos de vidrio estériles de 12 oz de capacidad, dispensando 150 mL de leche en cada frasco. Se utilizaron tres frascos con leche para evaluar cada método de congelamiento.

c. Tres frascos fueron colocados en una bandeja de acero inoxidable con hielo seco y alcohol etílico al 95%. Otros tres frascos fueron depositados en una bandeja de acero inoxidable con hielo/sal/alcohol etílico al 95% y los restantes tres frascos fueron colocados en un congelador a $-10\text{ }^\circ\text{C}$.

- d. La temperatura de los métodos de congelamiento fueron monitoreadas con un termómetro de alcohol graduado y calibrado con un rango de temperatura de -10 °C a 150 °C para la leche, y otro termómetro de -80 °C a 110 °C para monitorear la temperatura de la matriz de congelamiento.
- e. Adicionalmente se registró el tiempo en que la leche se congeló homogéneamente. Se consideró un congelamiento homogéneo cuando la leche alcanzaba una temperatura igual o menor a 0 °C y se apreciaba un estado sólido completo de la muestra.
- f. La evaluación de la integridad de los frascos de vidrio al ser sometidos a las temperaturas de congelamiento fue de carácter cualitativo. La presencia de fisuras o ruptura completa del frasco se consideraría como no resistente a la exposición. De encontrarse alteración en la integridad de los frascos de vidrio se procedería a repetir el experimento con frascos Pyrex®.

3. Fase experimental

La fase experimental consistió en la recolección de muestras de leche materna recién extraídas de donantes del banco de leche humana del Hospital de Antigua Guatemala, Pedro de Bethancourt. Se utilizaron alícuotas de estas muestras para ser sometidas a los métodos de congelamiento evaluados.

Para esta fase se utilizaron únicamente los métodos de congelamiento convencional y congelamiento rápido con hielo seco/alcohol etílico al 95%. El método de congelamiento rápido con hielo/sal/alcohol etílico al 95% ya no se utilizó, debido a que no presentó ventaja sobre el método de referencia con respecto al tiempo de congelación de la leche, ni estabilidad en la temperatura del sistema.

Las muestras fueron transportadas después de su congelamiento, al laboratorio de inmunología del Hospital Roosevelt, para la determinación de las concentraciones de inmunoglobulinas A y M.

4. Recolección de muestras de leche humana

Se realizaron visitas al banco de leche humana del Hospital Nacional de Antigua de Guatemala, Pedro de Bethancourt, ubicado en el departamento de Sacatepéquez. Se seleccionaron las muestras de las donadoras de leche humana que se apersonaron al banco de leche, recolectando alícuotas de 9 mL de cada porción de leche donada, salvo el caso en que la porción donada fuera menor a 150 mL (5 oz fl).

5. Preparación de muestras y congelamiento *in situ*

De cada porción de leche humana donada se tomó una muestra inicial de 3 mL, la cual se utilizó para la determinación de la concentración basal de inmunoglobulinas A y M. La porción donada restante fue fraccionada en dos alícuotas de 75 mL (2.5 oz fl) cada una y colocadas en frascos de vidrio separados. Estas dos alícuotas se utilizaron para la evaluación de los dos métodos de congelamiento (convencional y rápido), llevados a cabo en las instalaciones del banco de leche el mismo día.

6. Almacenamiento y transporte de muestras

Las alícuotas de las muestras de punto basal se almacenaron en una hielera hermética con unidades de refrigeración a una temperatura de 0 °C a 4 °C y fueron transportadas al laboratorio de inmunología del Hospital Roosevelt. Estas muestras fueron transportadas en un tiempo no mayor a 4 horas después de su recolección.

Las alícuotas sometidas a los métodos de congelamiento en el banco de leche se almacenaron posterior al congelamiento en un congelador a -18 °C. Al día siguiente estas muestras eran descongeladas en un baño de María a 37 °C EME equipment ABL-65 ®, de donde se tomaban alícuotas de 3 mL de cada uno de los frascos en tubos de ensayo rotulados y se almacenaban en la hielera para su transporte al laboratorio de inmunología del hospital Roosevelt.

Al llegar al laboratorio de inmunología, tanto las muestras basales como las tomadas después del proceso de congelación, se colocaron en una centrífuga Eppendorf 5810 R® a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se separaba el suero de la fase lipídica. Se extraía 1 mL de suero de cada muestra, colocando en un tubo

Eppendorf® rotulado y se almacenaban en un congelador a -20 °C hasta su análisis, según el método descrito por Pérez, Viada & Rojas, 1980.

7. Determinación de la concentración de inmunoglobulinas

La concentración de inmunoglobulinas fue determinada utilizando el método cuantitativo de turbidimetría con un kit comercial de BioNuclear®. Las inmunoglobulinas A y M presentes en la muestra son precipitadas en presencia de anticuerpos anti-IgA y anti-IgM respectivamente por el método de turbidimetría (Dati, 1996). La dispersión de luz generada por los complejos antígeno-anticuerpo es proporcional a la concentración de las inmunoglobulinas A y M (Friedman & Young, 1997) y pueden ser cuantificadas por turbidimetría a una longitud de onda de 600 nm (Narayanan, 1982). Dicha determinación se realizó utilizando el analizador Biosystem A25® en el Laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt.

Los resultados obtenidos fueron registrados en el analizador Biosystem A25®. Se aceptaron únicamente los resultados en que sus gráficas presentaron un comportamiento lineal para la formación del complejo de antígeno-anticuerpo. Posteriormente los datos obtenidos fueron tabulados en una base de datos. Se comparó la concentración basal y la concentración que se obtuvo después de someter la muestra al método de congelamiento rápido y el método convencional.

E. Análisis Estadístico

1. Diseño Experimental

La presente investigación se realizó con un diseño de bloques, colocando las concentraciones de IgA e IgM basales de 25 muestras en el bloque I y los valores obtenidos después del tratamiento ($T\alpha$) con cada método a evaluar en la columna J.

2. Análisis Estadístico

Se empleó estadística descriptiva, reportando promedios, desviaciones estándar y porcentajes de las concentraciones de IgA e IgM obtenidas antes y después de los procesos de congelamiento.

Se organizaron los resultados de la determinación basal de concentración de IgA e IgM pareadas con las concentraciones obtenidas después de cada uno de los procesos de congelamiento, organizados en bloques. Se aplicó la prueba de análisis de varianza de dos vías (ANDEVA), con la finalidad de detectar posibles diferencias entre los promedios obtenidos para la concentración de IgA e IgM de los distintos métodos de congelación utilizados. De haber existido diferencia significativa, se hubiese realizado la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher, comparando los grupos entre sí y con el nivel basal. Los resultados se consideraron significativos con una $p < 0.05$, tomando en cuenta un error $\alpha = 0.05$.

VIII. RESULTADOS

A. Plan Piloto

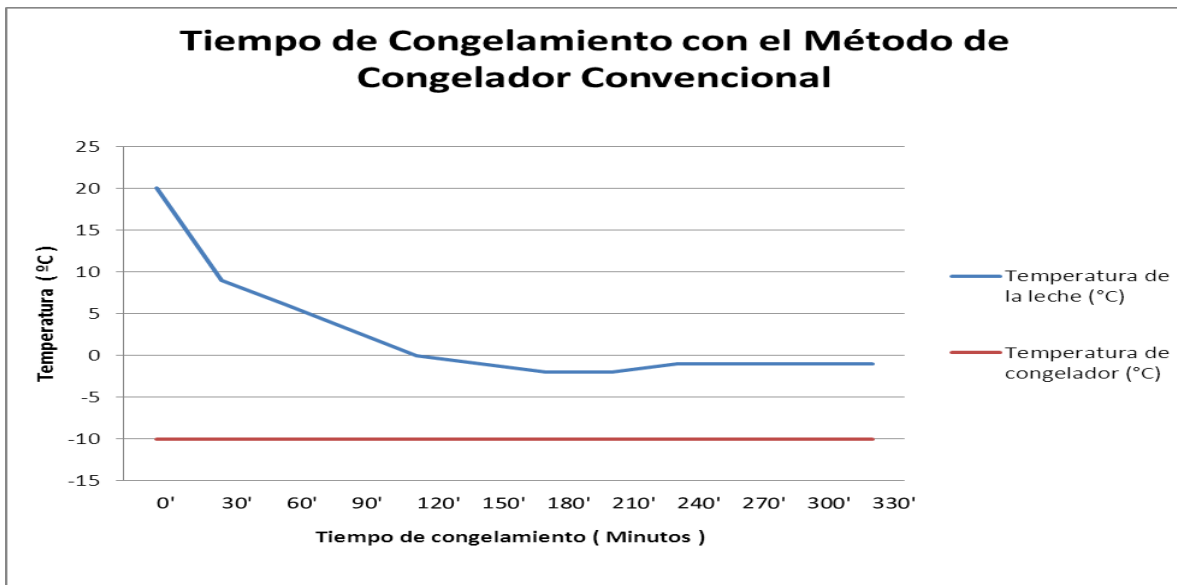
Para la realización de cada una de las dos fases del plan piloto se utilizaron 9 muestras de leche comercial, para evaluar la resistencia de los frascos de vidrio y el tiempo estimado de congelación. Comprobándose que los frascos de vidrio resistían las temperaturas de congelación (0 °C a -80 °C) sin dañarse.

Tabla No.1 Evaluación de la resistencia de los frascos a los cambios de temperatura en los métodos de congelamiento.

PLAN PILOTO			
Método de Congelamiento	Frasco No.1	Frasco No.2	Frasco No.3
Hielo seco/ alcohol etílico al 95%	Intacto	Intacto	Intacto
Hielo/ alcohol etílico al 95%/ sal	Intacto	Intacto	Intacto
Congelador (Método convencional)	Intacto	Intacto	Intacto

Fuente: Datos experimentales obtenidos del plan piloto en el Laboratorio del Departamento de Citohistología

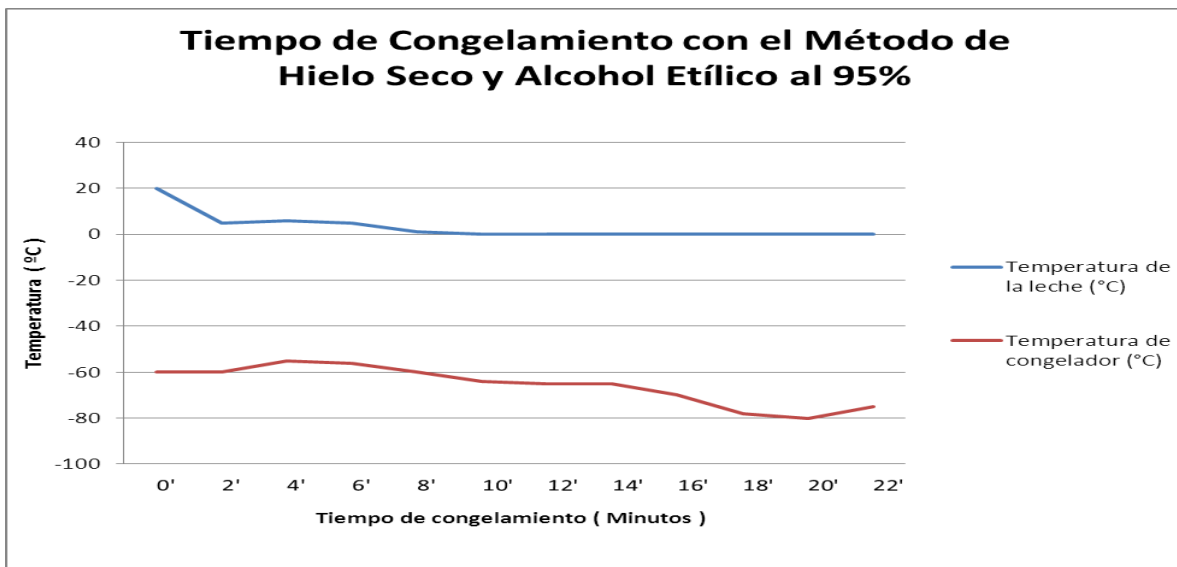
Gráfica No. 1 Método Convencional: Congelador



Fuente: Datos experimentales obtenidos del plan piloto en el Laboratorio del Departamento de Citohistología.

En la Gráfica No. 1 se presenta el tiempo de congelamiento con el método convencional, el cual consiste en la utilización de congeladores a -4°C , donde se evidencia un funcionamiento adecuado, con lo cual la leche llega a la temperatura de congelamiento en dos horas y media, sin embargo el congelamiento de la leche no se realiza de manera homogénea.

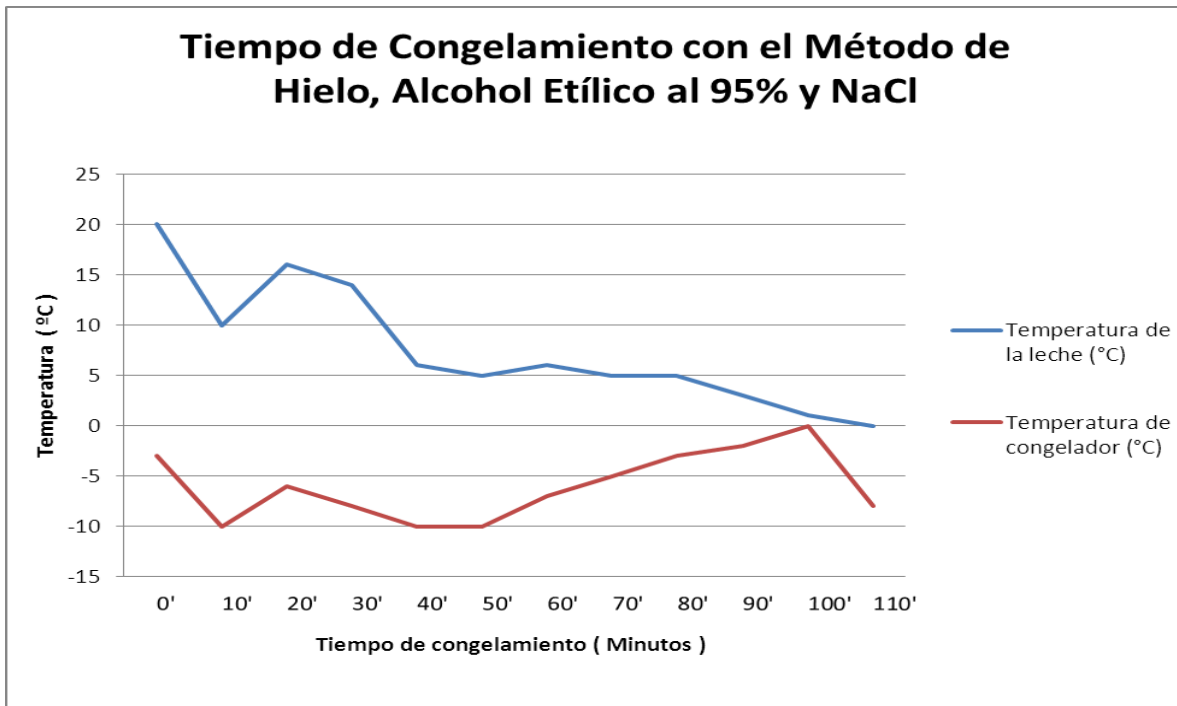
Gráfica No. 2 Método congelamiento rápido: Hielo seco/alcohol etílico 95%



Fuente: Datos experimentales obtenidos del plan piloto en el Laboratorio del Departamento de Citohistología.

En la Gráfica No.2 se observa la eficacia en el tiempo de congelamiento del método de congelamiento con hielo seco y alcohol etílico al 95%, ya que alcanzó temperaturas menores al punto de congelación en un período de 10 minutos, manteniéndose estable durante 30 minutos, realizando un congelamiento completo de la leche.

Gráfica No.3 Método congelamiento rápido: Hielo normal/sal/alcohol etílico 95%



Fuente: Datos experimentales obtenidos del plan piloto en el Laboratorio del Departamento de Citohistología.

En la Grafica No. 3 se muestra las variaciones de temperatura obtenidas con el método de congelamiento basado en hielo, alcohol etílico al 95% y sal, por lo cual se descartó como método a utilizar, por su incapacidad de congelar la leche en un tiempo corto, debido a las fluctuaciones de temperatura en el sistema.

B. Evaluación experimental de los métodos de congelación

Se recolectó un total de 25 muestras de leche materna provenientes del Banco de Leche Humana del Hospital Nacional de Antigua Guatemala, Pedro de Bethancourt. Las muestras se obtuvieron utilizando el protocolo estandarizado del banco de leche, en un transcurso de tres meses hasta completar la cantidad de muestras requeridas. Dado que las muestras obtenidas presentaban una variación en el volumen de las mismas, se tomaron alícuotas de 5 onzas de leche para someterlas a ambos métodos de congelamiento (congelador y hielo seco + alcohol etílico) para obtener resultados estandarizados como se describió anteriormente en la metodología.

Se determinó una concentración media inicial de IgA de 107.76 mg/dL, disminuyendo su concentración luego de ser sometida al método de congelamiento convencional a 100.32 mg/dL, así como también luego de aplicar el método de congelamiento rápido, basado en hielo seco/alcohol etílico al 95%, a 98.84 mg/dL. El decremento en la concentración de IgA fue de 6.9% con respecto al método convencional y de 8.3% con el método de congelamiento rápido.

Se obtuvo una concentración media inicial de IgM de 59.76 mg/dL. Luego de ser sometida al congelamiento se determinó una concentración media de 54.36 mg/dL por el método convencional y 51.28 mg/dL por el método de congelamiento rápido, presentando un decremento del 9.04% y del 14.19%, respectivamente.

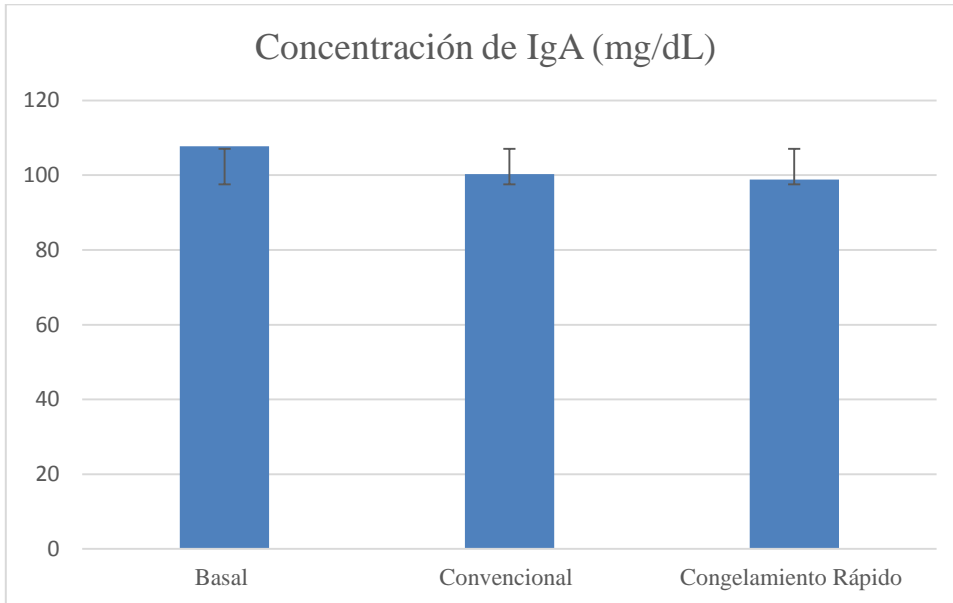
Tabla No. 2 Estadística descriptiva de la concentración basal y el método de congelador y el método de congelamiento rápido de las Inmunoglobulina A y M

IgA	Basal	Convencional	Congelamiento Rápido
Promedio	107.76 mg/dL	100.32 mg/dL	98.84 mg/dL
Desviación estándar	46.23	43.06	42.20
Porcentaje de pérdida		6.9%	8.3%
IgM			
Promedio	59.76 mg/dL	54.36 mg/dL	51.28 mg/dL
Desviación estándar	40.01	31.66	30.55
Porcentaje de pérdida		9.04%	14.19%

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt.

El análisis de varianza reflejó un valor de $p = 0.744$ para IgA y de $p=0.678$ para IgM, por lo que los métodos no tienen diferencia estadísticamente significativa para ambas inmunoglobulinas.

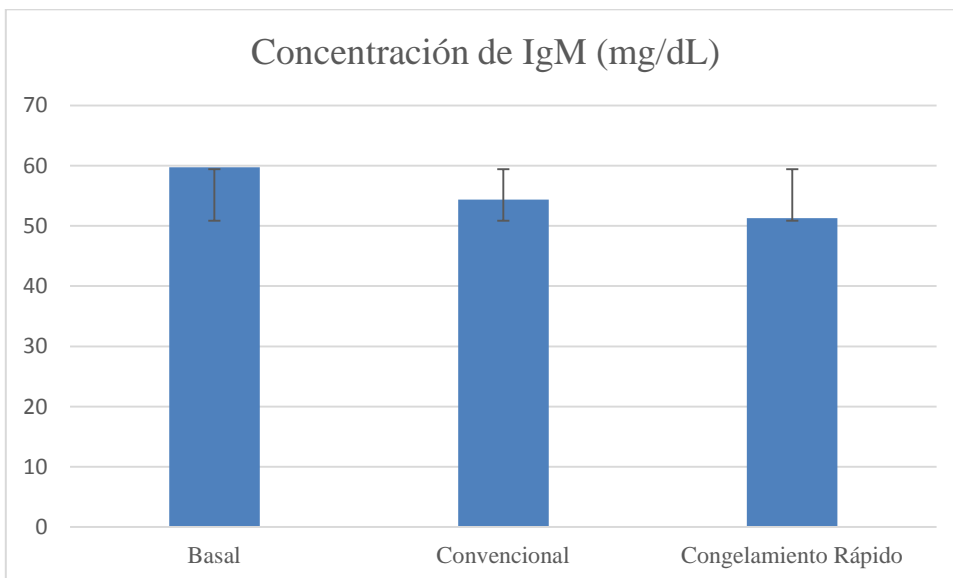
Gráfica No. 4 Concentración media de Inmunoglobulina A de las 25 muestras de leche materna procesadas por turbidimetría.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt.

En la Gráfica No. 4 se presenta un diagrama de barras en el que se compara la determinación de la concentración de la IgA en las muestras basales, método de congelador y método de congelamiento rápido. Se puede observar que hay un descenso de la concentración de IgA de la muestra basal al ser sometida a cualquiera de los dos métodos de congelamiento evaluados, no obstante el descenso neto de la concentración de IgA es similar entre ambos métodos.

Gráfica No. 5 Concentración media de Inmunoglobulina M de las 25 muestras de leche materna procesadas por turbidimetría.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt.

En la Gráfica No. 5 se observa que la concentración de la IgM, tomada en el punto basal, sufre un decremento al ser criopreservada la leche de manera semejante entre ambos métodos. En este caso en particular el congelamiento rápido produjo un descenso neto de la concentración de IgM mayor que el del método del convencional.

Tabla No. 3 Comparación de costo de los métodos estudiados.

Materiales	Método convencional (Congelador)	Método rápido (Hielo seco + alcohol etílico al 95%)
Refrigeradora con congelador	Q. 5000.00	
Hielo seco		Q. 77.50 /5 kilos
Alcohol etílico al 95%		Q. 60.00 cada galón
Bandeja de acero inoxidable		Q. 50.00
Total	Q.5000.00	Q.187.50

Fuente: Datos obtenidos por cotización.

La inversión de la refrigeradora con congelador utilizada en el método convencional es única al inicio de la implementación del banco de leche, mientras que la inversión para el método de congelamiento rápido con hielo seco y alcohol etílico al 95%, se realiza cada 3 días aproximadamente, ya que ese es el tiempo de vida del hielo seco, completando la inversión del congelador en 110 días.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar el efecto del congelamiento rápido en la concentración de las inmunoglobulinas A y M (IgA e IgM) presentes en la leche materna, utilizando muestras recolectadas en el Banco de Leche Humana del Hospital Nacional de Antigua Guatemala, Pedro de Bethancourt. La misión del banco de leche es proveer leches maternas ricas en componentes nutricionales e inmunológicos a recién nacidos prematuros o de bajo peso al nacer, por lo que surge el interés de una mejora en la preservación de sus componentes.

Esta investigación se inició con un plan piloto, donde se evaluaron tres métodos de congelamiento de leche materna, los cuales fueron: 1) utilización de un congelador a -4°C , 2) hielo-sal-alcohol etílico al 95% y 3) hielo seco-alcohol etílico al 95%, cuyo objetivo fue comprobar la resistencia a bajas temperaturas de los frascos de vidrio y establecer el tiempo de congelamiento en cada uno de los tres métodos comparados. Según los resultados obtenidos, se decidió ya no utilizar el método de hielo-sal-alcohol etílico al 95% debido a que el tiempo de congelamiento fue muy prolongado y el sistema no se mantenía a una temperatura estable, por lo que no ofrecía mayores ventajas sobre el método convencional del congelador utilizado en los bancos de leche humana (ver gráfica No. 3).

Los congeladores a -4°C utilizados en el banco de leche, congelan el producto almacenado aproximadamente en dos horas y media, sin embargo se obtiene un congelamiento no homogéneo de la leche contenida en los frascos de vidrio. A diferencia del método anterior, el método de congelamiento rápido con hielo seco-alcohol etílico al 95% congela homogéneamente la leche en un período de aproximadamente 10-15 minutos, manteniéndose el sistema estable a una temperatura de -80°C hasta por 30 minutos. Para obtener estos resultados se utilizó 0.825 kg (825 g) de hielo seco y 1000 mL de alcohol etílico al 95%. Cuando se observaba que se detenía la sublimación, esto nos indicaba que el sistema había alcanzado un equilibrio, por lo que si se alcanzaba antes de obtener la temperatura deseada (-80°C), se agregaba una fracción más de hielo seco, logrando un descenso en la temperatura del sistema, hasta llegar a la temperatura deseada.

Al evaluar la tendencia de los valores de concentración de IgA e IgM recuperados de cada muestra con ambas metodologías por medio de la correlación de Pearson, se determinó un coeficiente muy cercano a 1 (IgA de 0.996 e IgM de 0.948). Esto permite deducir que los valores obtenidos con el método de congelamiento rápido presentan una tendencia lineal con respecto a los obtenidos con el método convencional, sin presentar diferencia estadísticamente significativa entre ambos métodos de estudio para la preservación de IgA e IgM.

Considerando los resultados obtenidos para ambas inmunoglobulinas, se puede deducir que las dos metodologías evaluadas presentan la misma utilidad práctica en la criopreservación de la leche. El efecto del congelamiento en la leche permite que ésta conserve las características de la leche recién extraída a diferencia del proceso de refrigeración. Las proteínas permanecen estables hasta una temperatura de -20°C y sufren proteólisis a una temperatura óptima de 38°C (Regueiro, López, González, & Martínez, 1997). Sin embargo las inmunoglobulinas A y M presentan comportamientos complejos, a diferencia de otras proteínas. La IgA se comporta como dímero en secreciones y en la leche materna, y la IgM tiene una presentación pentamérica, aunque en su forma monomérica se encuentra en la superficie de los linfocitos B. Ambas inmunoglobulinas poseen una cadena J (glucídica) que permite la formación de los polímeros. Este componente o pieza secretora le confiere al anticuerpo una mayor resistencia al ataque proteolítico (Roitt, Brostoff, & Male, 2001).

Durante las varias determinaciones realizadas a través del estudio, se observó una marcada diferencia en la determinación de la concentración de IgA e IgM, tanto en la muestra basal como en la comparación por ambos métodos de congelamiento. Esto puede deberse a que la IgA es más abundante en la leche materna que la IgM y las demás inmunoglobulinas, representando la IgA en algunos casos hasta el 90% de las inmunoglobulinas en la leche materna (Maury, *et al.* 2010).

A pesar de que estadísticamente no existe diferencia significativa para la preservación de inmunoglobulinas entre ambas metodologías, se puede notar que el método de congelador presentó una ventaja sobre el método de congelamiento rápido al obtener un menor

porcentaje de pérdida. Por otro lado se debe mencionar que el método de congelamiento rápido depende de la disponibilidad y accesibilidad del hielo seco, el cual presenta una vida media de estantería (shelf life) aproximadamente de 3 días, por lo que se debe contar con un suministro constante de este insumo. Siendo una compra constante tanto de hielo seco como de alcohol etílico al 95% para llevar a cabo esta metodología, en comparación de un único gasto al comprar el congelador (Ver Tabla No.3). Este factor es el que hace poco rentable y operativamente difícil de aplicar esta metodología de congelamiento rápido rutinariamente.

El método de congelamiento rápido podría ser utilizado como un método alternativo para la preservación y/o almacenamiento de las inmunoglobulinas A y M en la leche humana inmediatamente después de finalizar el proceso de pasteurización, ya que se puede colocar directamente en el congelador a -20° C. Adicionalmente se propone la utilización de esta metodología en actividades donde sea difícil movilizar un congelador, como sucede en las jornadas de donación extrahospitalarias o las visitas domiciliarias, con el fin de evitar mantener las leches maternas a temperatura ambiente por tiempo prolongado, lo cual puede conllevar a su deterioro y pérdida de sus componentes inmunológicos y nutricionales. Se sugiere estudiar en un futuro la eficacia de este método para la conservación de otros componentes importantes de la leche humana.

X. CONCLUSIONES

- Se estableció que el método de congelamiento más eficiente fue el de congelamiento rápido, logrando un congelamiento de la muestra a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un promedio de 15 minutos. Ambos métodos presentaron la misma eficacia en la preservación de inmunoglobulinas.
- El método de congelador convencional comparado contra el método de congelamiento rápido con hielo seco/alcohol etílico al 95% presenta algunos beneficios adicionales, tanto en factores logísticos como económicos, debido a que no requiere de la compra constante de insumos, ni depende del limitado tiempo de almacenamiento del hielo seco para su implementación en un entorno hospitalario.
- El método de congelamiento rápido con hielo seco/alcohol etílico al 95% presenta mayores ventajas que pueden utilizarse en un entorno extrahospitalario, como jornadas de donación, visitas domiciliarias o situaciones en las no se cuenta con el método de congelación convencional.
- La preservación de la concentración de inmunoglobulinas A y M no presentó diferencia estadísticamente significativa entre ambos métodos de congelamiento analizados.

XI. RECOMENDACIONES

Debido a la importancia que representa la investigación en los bancos de leche humana y la constante necesidad de evaluar nuevas metodologías para preservar los componentes esenciales, es necesario realizar investigaciones más a fondo, tomando en cuenta la influencia de la fase de lactancia en la que se encuentre la donadora, la interacción y descomposición de los componentes de la leche y ampliar los puntos de determinación de estos compuestos durante todo el proceso hasta el producto final.

Estudios realizados anteriormente han utilizado un pool de muestras, por lo que se propone realizar un estudio longitudinal entre un grupo de madres que se encuentren en la misma fase de lactancia y realizar las determinaciones en los puntos críticos del procesamiento de la leche y durante su almacenamiento en el banco de leche. Aunado a esto y dado el entorno social, político y económico de las instituciones que prestan el servicio de banco de leche humana, siempre debe de considerarse un análisis de costo-efectividad y viabilidad de implementación de las nuevas metodologías propuestas.

Considerando que es necesario educar y concientizar a la población respecto a la donación voluntaria de leche humana, se sugiere promoverla realizando jornadas de donación en unidades móviles, en las cuales el método de congelamiento rápido con hielo seco y alcohol etílico al 95% puede ser de mucha utilidad. De esta forma se facilitaría la afluencia de madres donadoras que residen en sitios lejanos, logrando aumentar el volumen neto de recolección anual de leche.

XII. REFERENCIAS

- AAP (American Academy of Pediatrics). (2003). Recommendations for care children in special circumstances: Human milk. pp. 117-123.
- AAP (American Academy of Pediatrics). (2005). Policy Statement; Breastfeeding and the use of human milk, Pediatrics. 115(2), 496-506.
- Álvarez, N., Otero, O., Falero, G., Cádiz, A., Marcet, R., Carbonell, A. & Acosta, A. (2010). Purificación de inmunoglobulina A secretora a partir de calostro humano. Vaccimonitor, 19(3), pp. 26-29.
- Barrera, A., Santos, A., Alas, J. & Martínez, M. (2010). Métodos de Congelamiento. Universidad de El Salvador. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Escuela de Ingeniería Mecánica.
- Corteguera, R. (1998). Valor inmunológico de la leche materna. Revista Cubana de Pediatría. La Habana. 67(2), 2-12.
- Covas, M., Alda, E., Baeza, A., Ferrer, L. & Fernández, C. (2008). Almacenamiento de leche humana: su influencia en la composición química y desarrollo bacteriano en tres momentos de la lactancia. Servicio de Neonatología. Hospital Privado del Sur Bahía Blanca. Archivos Argentinos de Pediatría. Buenos Aires. (98)2, 92-98.
- Dati, F.; et al. (1996). Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference range for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/CAP reference material (CRM470). Eur J Clin Chem Clin Biochem. 34. p. 517-520.
- Díaz-Argüelles Ramírez-Corría, V. (2005). Lactancia materna: evaluación nutricional en el recién nacido. La Habana. Revista Cubana de Pediatría. 77(2), 1-10. Versión on-line ISSN 1561-3119.
- Eglash, A. (2010). ABM Protocolo clínico No. 8: Almacenamiento de Leche Humana. Medicina de la Lactancia Materna. 5(3), 127-130. doi: 10.1089/bfm.2010.9988
- Friedman & Young (1997). Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th (Ed.). AACC Press.

- Gormaz, M., Roqués, V., Dalmau, J., Vento, M., Torres, E., & Vitoria, I. (2011). Actividad de un banco de leche humana implantado en una unidad neonatal. *Acta Pediátrica. España.* 69(6), 283-287.
- Guerra, J., da Silva, P., Novak, F. & Sydronio, K. (2006). Bancos de leche humana y promoción de políticas públicas favorables a la salud materno-infantil. *Fundación Oswaldo Cruz. Revista Cubana de Salud Pública. La Habana.* (32)3. Versión on-line ISSN 0864-3466.
- Koenig, A., Diniz, E., Barbosa, S. & Vaz, F. (2005). Immunologic factors in Human Milk: The Effects of Gestational Age and Pasteurization. *Journal Of Human Lactation.* 21(439). doi: 10.1177/0890334405280652
- Lawrence, R. (1999). Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta Pediátrica. New York.* 88(439), 14-17. PMID: 10569218
- León-Cava, N., Lutter, C., Ross, J. & Martín, L. (2002). Cuantificación de los beneficios de la lactancia materna: reseña de la evidencia. Traducción y revisión Natalia Rybak y Fernando Vallone, M.D. *Fundación LAC-MAT. Buenos Aires.* 188 p.
- Macias, S., Rodriguez, S., & Ronayne, P. (2006). Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia. *Archivos Argentinos de Pediatría.* 104(5), 423-430.
- Maury, E., Sequera, S. Sánchez, D., Bravo, A., Romero, M., & Vizcarra, M. (2010). Variaciones en la composición proteica de la leche materna madura durante el almacenamiento por congelación. *Revista Pediátrica.* 37(3), 187-194.
- Ministério da Saúde. *Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano.* (2001) 4ta. (Ed.). Brasilia. (Série A. Normas e Manuais Técnicos, n. 117). pp. 19-26.
- Narayanan S. (1982). Method-comparison studies on immunoglobulins. *Clin Chem.* 28. pp. 1528-1531.
- Novak, F., Junqueira, A., Dias, M. & Almeida, J. (2008). Sensorial analyses of expressed human milk and its microbial load. *Rio de Janeiro.* 84.
- OMS (2012). *Lactancia Materna. Temas de Salud.* Recuperado de <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>.

- Pérez, L, Viada, A. & Rojas, J. (1980). Determinación de Inmunoglobulinas en el Calostro Humano. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Revista Chilena de Pediatría. Santiago. 51(2), 117-120.
- Price, C., Spencer, K & Whicher, J. (1983). Light-scattering immunoassay of specific proteins: a review. *Ann Clin Biochem.* 20. pp. 1-14.
- Regueiro, J., López, C., González, S., & Martínez, E. (1997). *Inmunología: Biología y patología del sistema inmunitario* (2da. ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Roitt, I., Brostoff, J., & Male, D. (2001). *Immunology*. Michigan: Mosby.
- Sabillon, F., & Abdu, B. (1997). Composicion de la Leche Materna. *Honduras Pediatrica*, Honduras. 18(4), 120-124.
- Shellhorn, C., & Valdés, V. (1995). La leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche de vaca. En *Manual de Lactancia para Profesionales de la Salud*. Chile: UNICEF.
- Tully, D., Jones, F & Tully, M. (2001). Donor Milk: What's in It and What's Not. *Journal of Human Lactation*. North Carolina. 17(2), 152-155.
- Vásquez, S., Alonso, C., Medina, C., Bustos, G., Martínez, M.V. & Pallás, C.R. (2009). Puesta en marcha del Banco de Leche Materna Donada en una Unidad Neonatal. Servicio de Neonatología. Hospital Universitario. Madrid. 71(4), 343-348. doi: 10.1016/j.anpedi.2009.06.008
- Weaver, L., Arthur, H., Bunn, J., & Thomas, J. (1998). Human milk IgA concentrations during the first year of lactation. *Archives of Disease in Childhood* , 78 (3), 235-239.
- Winter, W., Garrido, A., Pérez, H., Ramírez, L. & Toledo, A. (2011). Buenas Prácticas de Manufactura. Análisis críticos de peligro y puntos críticos de control en Bancos de Leche Materna exclusivo en Hospitales de Guatemala. (Tesis de Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala). Facultad de Medicina. Guatemala.

XIII. ANEXOS

Anexo. 1 Comparación de métodos de congelamiento para la preservación de la IgA

Análisis			Estadístico	Significancia
Correlación de Pearson			0.996	<0.001
ANOVA			F = 0.297	0.744
T pareada	Congelador congelamiento rápido	vs*	t = 1.84	0.078
T de Dunett	Basal vs congelador		Diferencia (I-J)= -7.44	0.774
	Basal congelamiento rápido	vs*	Diferencia (I-J)= -8.92	0.695
Games- Howell	Basal-congelador		Diferencia (I-J)= -4.43	0.494
	Basal-congelamiento rápido		Diferencia (I-J)= -3.02	0.642
	Congelador- congelamiento rápido		Diferencia (I-J)= -1.42	0.827

Fuente: Análisis estadístico; *vs = versus

Anexo No. 2 Comparación de métodos de congelamiento para la preservación de la IgM

Análisis			Estadístico	Significancia
Correlación de Pearson			0.948	<0.001
ANOVA			F = 0.391	0.678
T pareada	Congelador congelamiento rápido	vs*	t = 1.84	0.78
T de Dunett	Basal congelador	vs*	Diferencia (I-J)= -5.4	0.934
	Basal congelamiento rápido	vs*	Diferencia (I-J)= -8.48	0.748
Games- Howell	Basal-congelador		Diferencia (I-J)= -5.4	0.857
	Basal-congelamiento rápido		Diferencia (I-J)= -8.48	0.679
	Congelador- congelamiento rápido		Diferencia (I-J)= -3.08	0.935

Fuente: Análisis estadístico; *vs = versus

Anexo No. 3. Estandarización método de congelamiento rápido: Hielo seco/alcohol étílico al 95%



Anexo No. 4. Estandarización método de congelamiento rápido: hielo/sal/alcohol etílico al 95%



Diana Karina Baldizón Pernillo
Autora

Mirna Paola Morales Gutiérrez
Autora

MSc. Gerardo Arroyo
Asesor

Licda. Renata Moreira
Asesora

Lic. Claudio Gálvez
Revisor

M.A. María Eugenia Paredes
Directora

Dr. Rubén Velásquez
Decano