



Tesis para obtener el título de Licenciado en Bioquímica.

VALORACIÓN DE COMPONENTES CON ACTIVIDAD INMUNOLÓGICA Y EFECTOS DE LA PASTEURIZACIÓN EN CALOSTROS DONADOS EN EL BANCO DE LECHE HUMANA Dr. RUBEN PANIZZA.

Autor: Arturo Puyol Guerequiz

Orientadora: Prof. Adj. Dra. Ana Hernández

Cátedra de Inmunología.

**Instituto de Química Biológica. Facultad de Ciencias.
Departamento de Biociencias de la Facultad de Química.
UdelaR.**



**Banco de Leche Humana "Dr. RUBEN PANIZZA"
Centro Hospitalario Pereira Rossell. ASSE**

**Julio, 2015
Montevideo, Uruguay**

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a las instituciones que hicieron posible el desarrollo de este trabajo, en particular a CSIC a través del programa de Investigación y desarrollo orientado a la inclusión social por la financiación del proyecto “Nutrición del recién nacido: hacia la optimización de las propiedades inmunológicas de la leche donada en Bancos de Leche Humana” en el cual se encuadra este trabajo.

Quiero agradecerle a Ana, por confiar en mí, por toda su paciencia, por recibirme y hacerme sentir siempre muy cómodo dándome la oportunidad de trabajar en su equipo. Por su invaluable dedicación, por sobre todas las cosas siempre estar dispuesta a enseñar y ayudarme, contribuyendo de forma muy importante en mi formación.

En especial le agradezco a Claudio, por su valiosa colaboración durante este tiempo, por su apoyo, consejos y sugerencias para poder mejorar los resultados de mi trabajo.

Agradezco a la Dra. Cecilia Abirached por aceptar corregirme la tesis de grado y por sus valiosos comentarios sobre el manuscrito de este trabajo.

El equipo de compañeros del BLH se merece un GRACIAS enorme por apoyarme y darme desde el principio las fuerzas para poder conseguirlo, en especial a Laura y Mara por su disposición y cooperación en todo momento.

A mis compañeros de estudio por los momentos compartidos durante el transcurso de la carrera.

Finalmente quiero darles las gracias a mi familia y amigos por el apoyo incondicional brindado durante todo este tiempo. Agradezco también a mi novia por todo su amor y por iluminar mi camino. Quienes me han visto trabajar sin parar, a la espera que llegue el gran día de terminar con la tesis, siempre dándome ánimo y compartiendo la alegría del futuro recibimiento.

A todos, muchas gracias!

Índice

Agradecimientos.....	2
Índice	3
Resumen.....	5
Abreviaturas	6
1. Introducción	7
1.1. El sistema inmune del recién nacido y la lactancia	9
1.2. Propiedades dinámicas de la leche materna.....	10
1.3. Composición de la leche humana.....	11
1.3.1. Los componentes bioactivos y las defensas.....	12
1.3.2. Los componentes bioactivos y la inmunoregulación.....	13
1.4. Efectos de la pasteurización sobre los componentes con actividad inmunológica de la leche humana	15
2. Objetivos.....	16
3. Materiales y Métodos.....	17
3.1. Población y muestras de estudio.....	17
3.2. Procesamiento de los calostros en el BLH.....	17
3.2.1. Análisis Físicoquímicos	17
3.2.1.1. Análisis organoléptico	17
3.2.1.2. Acidez Dornic.....	18
3.2.1.3. Contenido energético	18
3.2.2. Pasteurización de Holder y validación microbiológica	19
3.3. Obtención de la fracción acuosa del calostro.....	19
3.4. Cuantificación de proteínas totales.....	20
3.4.1. Método de Bradford.....	20
3.4.2. Absorción UV ($A_{280/260}$).....	20
3.5. Método de ELISA para determinación de compuestos bioactivos.....	21
3.6. Determinación de Anticuerpos IgA e IgM Totales.....	22
3.7. Determinación de citoquinas	23
3.7.1. TGF- β 2	23
3.7.2. IL-10	23
3.8. Expresión de resultados y tratamiento estadístico	24

4. Resultados	25
4.1. Contenido energético	25
4.2. Contenido proteico.....	25
4.2.1. Evolución con el tiempo	25
4.2.2. Efectos de la Pasteurización	27
4.3. Inmunoglobulinas	29
4.3.1. IgA.....	29
4.3.1.1. Evolución con el tiempo	29
4.3.1.2. Efectos de la Pasteurización	29
4.3.2. IgM.....	30
4.3.2.1. Evolución con el tiempo	30
4.3.2.2. Efectos de la Pasteurización	30
4.4. Citoquinas Inmunoreguladoras	32
4.4.1. TGF- β 2	32
4.4.1.1. Evolución con el tiempo	32
4.4.1.2. Efectos de la Pasteurización	33
4.4.2. IL-10	35
4.4.2.1. Evolución con el tiempo	35
4.4.2.2. Efectos de la Pasteurización	35
4.5. Análisis global del efecto de la pasteurización de Holder	36
5. Discusión.....	38
5.1. Evolución del contenido energético y proteico con los días de lactancia.....	38
5.2. Componentes inmunológicos en calostros crudos.....	40
5.2.1. Inmunoglobulinas	40
5.2.2. Citoquinas.....	40
5.3. Efecto de la Pasteurización de Holder.....	43
5.3.1. Efectos de la pasteurización de Holder sobre la concentración de Proteínas Totales de calostros	43
5.3.2. Efectos de la pasteurización de Holder sobre la concentración de Inmunoglobulinas de calostros	44
5.3.3. Efectos de la pasteurización de Holder sobre la concentración de Citoquinas de calostros	45
6. Conclusiones.....	47
7. Bibliografía.....	48
8. Anexo.....	53

Resumen

El presente estudio se realizó con el objetivo de caracterizar la composición dinámica de los calostros del Banco de Leche Humana del Centro Hospitalario Pereira Rossell (BLH-CHPR) desde el punto de vista inmunológico, con el objetivo final de optimizar el aporte de compuestos bioactivos que participan en las defensas y mecanismos de inmunoregulación del recién nacido, valorando las pérdidas por pasteurización y utilizando métodos de potencial aplicación en el laboratorio del BLH-CHPR.

Se analizaron en paralelo 67 calostros crudos y pasteurizados. Para poder evaluar la evolución temporal de los diferentes componentes, se realizó una clasificación arbitraria de los calostros, basados en las características altamente dinámicas que presenta la composición de la leche humana, definidos en tres grupos de acuerdo al día post parto (dpp) en que se realizó la extracción materna: calostro temprano (1-2; n=13), calostro intermedio (3-5; n=45) y calostro tardío (6-7; n=9). Proteínas totales se valoraron por los métodos de Bradford y Absorción UV ($A_{280/260}$), mientras que por medio de ELISA de captura se determinaron el contenido de Inmunoglobulinas (IgA e IgM) y citoquinas (TGF- β 2 e IL-10).

El contenido energético (kcal/L) de las muestras de calostros se obtuvo por el método del crematocrito utilizado de rutina en los BLH.

Los calostros crudos mostraron una tendencia a la disminución de los niveles de IgA, IgM y TGF- β 2 con el tiempo (medianas: 1.30 g/L; 0.045 g/L y 2077 pg/mL respectivamente) y la concentración de proteínas disminuyó significativamente a partir del sexto dpp en muestras pasteurizadas.

La IL-10 se detectó solamente en el 10% de calostros crudos, correspondientes principalmente a calostros tempranos (2 dpp).

El contenido energético de los calostros crudos no mostró diferencias significativas durante la primer semana de lactancia.

La pasteurización no modificó el contenido proteico total pero disminuyó significativamente el aporte de IgA (20-28%), TGF- β 2 (22-37%) y drásticamente el aporte de IgM (79-85%).

Como conclusiones se desprende la importancia de jerarquizar el uso de los calostros tempranos para seleccionar lotes con máxima actividad inmunológica.

Los resultados alientan la búsqueda de alternativas al tratamiento convencional para maximizar el aporte de componentes inmunológicos.

Palabras claves

Calostro, Pasteurización, Proteínas totales, Inmunoglobulinas, Citoquinas.

Abreviaturas

AP, antes de la pasteurización

BLH, Banco de Leche Humana

BSA, albúmina de suero bovino

CHPR, Centro Hospitalario Pereira Rossell

DP, después de la pasteurización

dpp, día post parto

ELISA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima

IDR, inmunodifusión radial

Ig, inmunoglobulina

IL, interleuquina

MSP/ASSE, Ministerio de Salud Pública/Administración de los Servicios de Salud

OMS, Organización mundial de la salud

PBS, buffer fosfato salino

SFB, suero fetal bovino

TGF, factor transformador del crecimiento

UNICEF, Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia

UV, ultravioleta

1. Introducción

Estudios epidemiológicos muestran en forma contundente los beneficios de la leche materna en múltiples aspectos; además del aporte energético que representa, es fundamental para el desarrollo y funcionamiento del sistema inmune del recién nacido así como para la transferencia pasiva de protección frente a infecciones debido a la presencia de múltiples componentes bioactivos que se traduce en beneficios a corto plazo (en el primer año de vida) como la disminución del riesgo de muerte súbita, disminución de la gravedad de enfermedades infecciosas agudas, entre otros. La evidencia científica demuestra a su vez, que algunos de estos componentes contribuyen a la prevención de patologías con una base inmunológica como las alergias y las enfermedades autoinmunes (Tuly et al., 2001), sumado al gran impacto que tiene en el desarrollo cognitivo para toda la vida, por lo que los beneficios se proyectan en el mediano y largo plazo.

Las madres de bebés hospitalizados de bajo peso, en su mayoría prematuros o sometidos a cirugía, generalmente ven impedido transitoriamente el amamantamiento.

En el caso de que la madre no pudiese amamantar al recién nacido, existe la opción de alimentarlo con la leche humana de otras madres, o con los preparados comerciales para lactantes.

De hecho el aporte de nutrientes y componentes bioactivos que suministra la leche humana es muy ventajoso respecto a la alimentación con fórmulas.

De acuerdo con la reunión conjunta OMS/UNICEF, “el mejor alimento para el recién nacido que no puede ser alimentado directamente con el pecho de su madre, es la leche extraída de su propia madre (leche materna) o la extraída de otra madre sana (leche humana). Por ello es necesaria la existencia de bancos de leche humana (BLH) (Wight, 2001)” y cada vez se promueve más la alimentación con leche humana donada en los servicios de neonatología como un recurso beneficioso para la salud y la economía (Underwood, 2013).

Por lo tanto, la leche humana proveniente de BLH se torna una excelente alternativa nutricional para niños prematuros, de bajo peso, víctimas de enfermedades infecciosas, diarrea e inmunosupresión, cuando la leche de sus madres no está disponible. La leche de las donantes debe ser pasteurizada antes de suministrarse a los niños para evitar la transmisión de enfermedades infecciosas (Lawrence, 1999; Almeida, 2008b).

Promover la lactancia y el cuidado de la salud de los niños prematuros de nuestro país es una prioridad del Programa Nacional de Salud de la Niñez del MSP.

En nuestro país, funciona desde el año 2003 el Banco de Leche Humana del Centro Hospitalario Pereira Rossell (BLH-CHPR) integrado por un equipo multidisciplinario, es el referente a nivel nacional de los Bancos que integran la Red Uruguaya de Bancos de Leche que incluye a los bancos ubicados en Salto y Tacuarembó e integra junto a otros países de Ibero América la Red Iberoamericana de BLH.

El BLH es una alternativa innovadora a nivel de la salud y tiene como finalidad principal apoyar a las madres en la lactancia y mantener la excelencia en la nutrición, permitiendo generar la seguridad alimentaria para la población de recién nacidos internados en las unidades neonatales que por alguna razón no pueden ser alimentados por su propia madre (por ejemplo, madres que no tienen el suficiente volumen para su alimentación completa, infecciones maternas (ej. HIV), tratamientos farmacológicos de la madre (ej. antirretrovirales, quimioterapia), consumo de drogas y patologías metabólicas del recién nacido), garantizando un alimento lo más similar posible a la leche de su propia madre.

La reglamentación del funcionamiento de los BLH, que tienen como objetivos la promoción, protección y apoyo a la lactancia materna, así como fomentar la donación de leche humana para aumentar la leche procesada en los BLH para luego ser administrada a los recién nacidos internados más vulnerables, han llevado al aumento de la tasa de lactancia, encontrándose en 2007 en un 57,1% y alcanzando en el 2011 el 65,2% (último dato disponible).

La Red Uruguaya de BLH es una estrategia innovadora a nivel nacional ejemplo de ello, además de lo anteriormente mencionado es que durante el año 2013 fueron asistidas más de 10.000 mujeres en lactancia materna, de las cuales 1550 se transformaron en donantes voluntarias lo cual permitió recolectar 4075 litros de leche humana que luego de ser procesada permitió alimentar a 1525 recién nacidos generando un stock de reserva igual a dos meses de consumo, lo que ha permitido eliminar la diarrea intrahospitalaria y reducir la incidencia de enterocolitis necrotizante, que tiene un alta morbilidad entre los recién nacidos prematuros.

Nuestro faro y guía sigue siendo la frase expresada por el Profesor Dr. Morquio a principios del siglo XX: “un niño alimentado a pecho raramente enferma y nunca muere”.

Si bien el aporte que realizan los BLH a la sociedad es indiscutible, a nivel mundial se realizan esfuerzos constantes para estandarizar y optimizar los procedimientos de obtención y conservación de las muestras. Además hay interés en tener una caracterización más completa sobre la composición de las leches y calostros de cada centro, y disponer así de herramientas para valorar las propiedades inmunológicas de las muestras en forma complementaria a la determinación del aporte calórico y valoración general de la leche de las donantes que ingresan al banco.

Por lo tanto, se requieren más conocimientos básicos y tecnológicos para lograr igualar las propiedades de la leche materna con la leche donada y procesada en un BLH (Moro & Arslanoglu, 2012; Menon & Williams, 2013).

Hasta el presente, la valoración de la leche de las donantes que ingresan al banco se realiza de acuerdo a los criterios y normas establecidos por la Red Brasileña de BLH (www.redeblh.fiocruz.br). El BLH colecta, procesa y almacena leche de mujeres saludables. La administración segura de la leche donada implica un procesamiento en el laboratorio. La leche se recibe congelada y es sometida a un riguroso control de calidad, evaluando en principio sus propiedades fisicoquímicas, donde se calcula el aporte calórico a partir de la estimación del contenido graso por determinación del crematocrito. Luego cada lote individual se pasteuriza mediante un calentamiento a 62.5°C durante 30 minutos (Pasteurización de Holder), inmediatamente se realiza el control microbiológico, lo que garantiza que solamente los lotes que estén libres de microorganismos patógenos y contaminación adquirida durante la manipulación, sean liberados para su adjudicación.

No se dispone aún de información proveniente de nuestra red de BLH sobre el contenido de componentes bioactivos, cuya concentración no se relaciona directamente con el aporte energético. Por lo tanto no hay criterios para seleccionar las muestras de leche con máximo aporte de componentes con actividad inmunológica y poder tener en consideración el balance del aporte calórico/inmunológico que puede ser necesario para situaciones particulares, de acuerdo al criterio médico. Tampoco se dispone de estudios que valoren los efectos deletéreos del proceso de pasteurización sobre la calidad inmunológica de la leche.

En condiciones ideales, la leche de cada madre es óptima para la nutrición de su recién nacido, acoplándose a sus necesidades en cada momento. De este modo, la composición de la leche producida por madres que dan lugar a prematuros presenta ciertas diferencias con la de madres de recién nacidos a término, precisamente para cubrir las deficiencias que presenta el lactante prematuro (Schanler et al., 1999). A su vez, la leche tiene una composición dinámica que va variando a lo largo de los días para estabilizarse en la etapa de leche madura (a partir de los 15 dpp), pasando por una etapa intermedia (leche de transición) entre la madura y el calostro que es la leche inicial, secretada desde las primeras horas hasta los primeros 7 dpp, quien representa la secreción materna con máximo aporte de componentes bioactivos (Ballard & Morrow, 2013). A tal punto que su administración es considerada como una terapia oral y existen en el mercado preparaciones comerciales derivadas de calostro bovino en base a estas propiedades, aunque solamente el calostro humano es apropiado para niños prematuros.

En base a estas características únicas del calostro es que nuestro trabajo se ha focalizado principalmente en esta etapa de la secreción láctea.

1.1. El sistema inmune del recién nacido y la lactancia

La extensión y funcionalidad del sistema inmune de los mamíferos es limitado al nacer; un ratón recién nacido tiene solamente el 1% del sistema inmune de un animal adulto (Adkins, 1999) y aunque en humanos tal estimación es compleja, se considera que el número de las células productoras de Inmunoglobulina A (IgA) en la mucosa intestinal aumenta hasta 10 veces durante las primeras semanas de vida siendo tal compartimento la principal vía de entrada de patógenos, con una superficie expuesta que supera en gran medida a la superficie de la piel y tracto respiratorio.

Además de la menor extensión del sistema inmune del recién nacido, su funcionalidad es limitada en varios aspectos, por ejemplo en el cambio de clase de las inmunoglobulinas, en la población de células B de zona marginal de bazo que cumplen funciones muy importantes en infecciones sistémicas por bacterias encapsuladas, la producción de citoquinas es más limitada que un adulto así como la función fagocítica (Brandtzaeg et al., 1991).

La lactancia materna exclusiva durante los primeros 6 meses de vida por madres sanas y con buen estado nutricional recomendada por la Organización Mundial de la Salud y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia, le ofrece al niño el alimento ideal y sigue siendo la óptima fuente de lácteos aportando los nutrientes y componentes bioactivos necesarios para su normal desarrollo durante los primeros dos años, al ser complementada con otros alimentos (OMS, 2003).

La leche materna además del aporte nutricional debe ser considerada como “la primera vacuna” que recibe el niño desde el punto de vista inmunológico ya que lo protege contra numerosas infecciones a las que está expuesto durante el primer año de vida (Field, 2005). Garantizando el aporte de nutrientes y moléculas con actividad biológica con efecto local que contribuyen a la barrera intestinal del lactante y también con efectos sistémicos al desarrollo del sistema inmune inmaduro, a las defensas frente a infecciones y al establecimiento de los mecanismos de tolerancia inmunológica que controlan el desarrollo de patologías con base inmunológica como las alergias, compensando las deficiencias durante el período de maduración para lograr un desarrollo completo del sistema inmune del niño (Gregory & Walker, 2013).

Los anticuerpos maternos, en su mayoría Inmunoglobulina A secretoria (IgAs) son las moléculas inmunológicamente activas mayoritarias en la leche, brindan protección al niño en la etapa en que su sistema inmune aun es inmaduro junto con moléculas con actividad microbicida; además de esta función efectora los anticuerpos regulan la inducción de respuesta inmune hacia los componentes inocuos como los antígenos de la dieta, que podrían generar alergias alimentarias o enfermedades autoinmune si tales mecanismos de tolerancia o inmunoregulación son alterados.

Durante la lactancia se desarrolla y activa el tejido linfoide relacionado con las mucosas (MALT) del bebé, en el intestino, los pulmones, las vías genitales, y en las glándulas mamarias, salivales y lagrimales. Este proceso se realiza a través del mecanismo bronco-entero-mamario, donde tienen lugar una serie de mecanismos en el intestino, tejido linfoide y glándula mamaria de la madre lactante con objeto de producir una gran cantidad de IgAs (Lawrence & Pane, 2007).

Cuando la madre entra en contacto con antígenos del medio ambiente (bacterianos, virales, etc.,) en la mucosa del epitelio respiratorio o intestinal son capturados por las células M que pertenecen al tejido linfoide de las mucosas (MALT), y transportados a las placas de Peyer. Aquí se elaboran los antígenos de los macrófagos y son presentados a los linfocitos T, de donde surgen las subpoblaciones de linfocitos B, lo que hace proliferar las células precursoras productoras de anticuerpos. Estas células emigran por los ganglios linfáticos regionales del mesenterio y llegan al conducto torácico, donde se dividen en tres compartimentos: las glándulas mamarias, los tejidos linfáticos del intestino materno y el sistema bronquial. En estas regiones maduran y se transforman en células plasmáticas productoras de IgA. Inicialmente las IgA son monómeros, en las células epiteliales de las glándulas exocrinas (mama, lagrimal, salival), los sistemas respiratorio, digestivo y urinario, se unen en pares con la cadena J para formar el dímero de IgA; se fijan a las glicoproteínas (componente secretor) para resistir y protegerse de la digestión enzimática y están listas para ser transportadas a través de las células epiteliales y aparecer en las secreciones exocrinas en la superficie de las membranas mucosas (Brandtzaeg, 2010).

La leche materna contiene gran cantidad de componentes inmunológicos tanto humorales como celulares que constituyen un sistema cuya función protectora se opone a los antígenos de virus, bacterias y parásitos reportándose eficaz contra *E. coli*, *Salmonella*, *Campilobacter*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* y *G. lamblia*.

También se han encontrado anticuerpos IgA contra proteínas de alimentos como la leche de vaca, la soya y el frijol negro. No promueve inflamación ya que no activa complemento y por lo tanto no consume energía.

1.2. Propiedades dinámicas de la leche materna

La leche materna es un fluido complejo y altamente dinámico, su composición varía tanto de una madre a otra y en cada mujer, en el transcurso del día e incluso durante una misma lactada. La fracción más estable es la proteica y la de mayor variabilidad, la grasa.

Su producción responde a una regulación neuroendócrina y su composición está influida tanto por factores intrínsecos a la propia glándula mamaria, como por factores externos condicionados por los nutrientes y sustancias químicas que la madre ingiere. Es precisamente esta característica particular la que la adapta perfectamente a las necesidades del lactante en cada momento (Neville et al., 2001).

La composición varía a lo largo del día y del periodo de lactancia, de manera que la leche secretada en las primeras horas después del parto (calostro) y la producida al cabo de un mes (madura) difieren enormemente en su composición general, esto permite dividir la lactancia materna en tres fases en que la leche se clasifica según los días post parto (dpp) a la que pertenece: calostro (primeros 7 dpp), de transición (8-15 dpp) y madura (dpp 16 en adelante); la composición de la leche varía en estas etapas en forma más notoria para algunos componentes como por ejemplo las inmunoglobulinas que tienen su máxima concentración en el calostro y luego disminuye (Rodríguez-Palmero et al., 1999).

A parte de esta variabilidad de la leche a lo largo del tiempo, también se ha encontrado variabilidad entre la producida por diferentes mujeres, atribuido a diversidad de factores como la dieta materna, la raza, el estado nutricional y el tiempo de gestación al momento del parto. En particular, algunos estudios recientes muestran que el estado gestacional y la duración de la lactancia tienen gran impacto sobre la composición de la leche (Picciano, 2001; Castellote et al., 2011). Otro estudio realizado por Koenig et al., (2005) sobre el contenido proteico en muestras de calostro en tres grupos de madres de diferente edad gestacional (<32, 32-36 y ≥37 semanas de gestación) obtuvo que la mayor concentración de proteínas totales correspondió al grupo de madres con recién nacidos a pre-término, dado principalmente por la IgA, demostrando la adaptabilidad de la composición de la leche a las necesidades del recién nacido (Montagne et al., 1999).

El calostro se caracteriza por presentar un color amarillento dado por la presencia de altas concentraciones de beta-carotenos, es espesa por su alta densidad (1040-1060 g/L) y tiene un pH (7.45) que favorece el vaciamiento gástrico.

Su volumen puede variar de 20 a 100 mL/día en el transcurso de los tres primeros días; y aumenta en forma progresiva en relación directa con la intensidad y frecuencia del estímulo de succión del bebé hasta 580 mL/día hacia el sexto día; tanto el volumen como su osmolaridad van variando a lo largo de los días para adaptarse a las necesidades del recién nacido en base a su madurez.

Tiene un 87% de agua y el máximo contenido de proteínas (destacando la alta concentración de IgA), vitaminas liposolubles, factores de crecimiento, *Lactobacilos bifidus*, y algunos minerales (sodio y zinc). En concentraciones menores se encuentran las grasas, la lactosa y las vitaminas hidrosolubles (Lawrence & Lawrence, 2007).

El calostro le confiere la condición protectora al recién nacido contra infecciones ya que transfiere inmunidad pasiva por absorción intestinal de inmunoglobulinas, altas concentraciones de lisozima y además contiene gran cantidad de macrófagos y linfocitos (2000 a 4000/mm³).

1.3. Composición de la leche humana

La leche humana reúne en su composición más de 250 sustancias diferentes, dispuestas de forma jerarquizada y compartimentada, integrando tres subsistemas o fracciones: emulsión, suspensión coloidal y solución.

La emulsión incluye a los componentes liposolubles (grasas, aceites, vitaminas, pigmentos y algunos ácidos grasos libres) y gran parte de los componentes liposolubles están presentes en forma de glóbulos, envueltos por una membrana fosfolipoproteica. Esta membrana es la misma de la célula alveolar de la glándula mamaria, y es responsable por dar estabilidad a la emulsión.

La suspensión coloidal del tipo gel está constituida por micelas de caseína que asocian la mayor parte del calcio y fósforo que aporta la leche.

En la fracción solución se reúne el agua, principal constituyente de la leche humana y los demás hidrosolubles como las proteínas solubles, sales minerales, carbohidratos y la mayor parte de los componentes con actividad inmunobiológica como ser inmunoglobulinas (principalmente IgAs y menores cantidades de IgM, IgG) y péptidos con efectos inmunomoduladores (TGF- β e IL-10).

Se ha considerado que los constituyentes liposolubles que integran la fracción emulsión se relacionan en forma inversamente proporcional con las proteínas solubles de la leche, lo cual implicaría que el contenido energético de la leche es inversamente proporcional al aporte en inmunobiológicos (Almeida, 2008a).

Es así que la leche humana con un contenido energético bajo podría ser rica en sustancias protectoras con acción química o biológica en el tracto digestivo del lactante.

Las proteínas constituyen el 7% de la energía de la leche y son los principales elementos plásticos necesarios para el crecimiento y desarrollo de los humanos.

Entre los mamíferos, la leche humana posee la concentración más baja de proteína. Sin embargo es la cantidad adecuada para el óptimo crecimiento del niño.

La cantidad y calidad influye en el metabolismo y ritmo de crecimiento de los recién nacidos. Estas proteínas de la leche están adaptadas a las necesidades del recién nacido; a mayor velocidad de crecimiento, mayor contenido en proteínas (Jiménez, 2001).

El tipo de proteínas que contiene la leche humana, la hacen única para la especie humana, ya que son consideradas de buena calidad al contener los 10 aminoácidos esenciales (metionina, valina, leucina, lisina, isoleucina, cistina, histidina, treonina, triptófano, fenilalanina) en una secuencia adecuada y por presentar mejor biodisponibilidad gracias a la presencia de enzimas digestivas como la amilasa.

Las proteínas de la leche humana se dividen principalmente en dos grupos: las proteínas del suero (70-80%) y las caseínas (20-30%) (López-Álvarez, 2007).

Entre las proteínas del suero la más abundante es la α -lactoalbúmina (37%), seguida de lactoferrina, IgAs, lisozima y lipasa estimulada por sales biliares. Su importancia estriba en que actúa como cofactor en la biosíntesis de lactosa. Tiene baja alergenicidad, debido a un peso molecular de 14,500 Da, mucho menor si se compara con la β -lactoglobulina, que llega a pesar 36,000 Da, como en la leche entera de vaca y por tanto, en las fórmulas infantiles (Lönnerdal, 2003).

La caseína, contribuye al transporte de calcio, fósforo y aminoácidos para fines estructurales a nivel celular a través de la formación de micelas. En la leche materna sólo hay dos de las tres subunidades que existen: la β -caseína que se une con la K-caseína y con los iones de fósforo para formar micelas de pequeño tamaño (30-75 nm) que comparado con los 600 nm que mide la α -caseína de la leche de vaca, son mejor digeridas en el intestino del bebé.

Su mayor concentración se obtiene durante las primeras semanas post parto y va decreciendo con el establecimiento de la lactancia (desde 15.8 hasta 8-9 g/L), independientemente de las proteínas que consume la madre.

En los primeros días post parto (calostro) la leche humana tiene una relación proteínas del suero/caseína de 90/10; cambia a 60/40 hasta los ocho meses y se mantiene en 50/50 hasta el fin de la lactancia, lo cual la vuelve fácilmente digerible (Lönnerdal, 2003).

1.3.1. Los componentes bioactivos y las defensas

Como inmunoglobulina se destaca la presencia de IgAs en todos los estadios de la lactancia, pero principalmente en el calostro, llegando a niveles máximos al segundo ddp (Castellote et al., 2011). Igualmente la leche humana contiene cantidades menores de IgA monomérica, IgM e IgG.

La IgAs es indiscutiblemente el principal componente inmunológico de la leche humana y presenta propiedades especiales respecto a las otras inmunoglobulinas, como una mayor estabilidad y resistencia frente al pH digestivo bajo y a la acción de las enzimas proteolíticas, constituyendo una función central en las defensas del niño mientras aún no sintetiza sus propios anticuerpos, contra infecciones en general y del tracto digestivo en particular (Jiménez, 2001). Hasta el 88% de la IgA ingerida puede ser recuperada en las heces del lactante (Brandtzaeg, 2003).

La IgAs en la leche deriva de plasmocitos diferenciados en el intestino de la madre contra patógenos y flora normal, ya que parte de las células productoras de anticuerpos diferenciadas en las placas de Peyer migran a través del mecanismo bronco-entero-mamario y colonizan la glándula mamaria, habiendo luego secreción mediante el epitelio donde adquiere el componente secretorio a través del proceso de transcitosis, el cual involucra la unión al receptor polimérico de inmunoglobulina (IgRp) en la cara baso-lateral de las células epiteliales, seguido de liberación y translocación al lado apical en forma de complejo con el componente secretor (Brandtzaeg, 2010). Es así que el niño recibe anticuerpos específicos contra un repertorio de patógenos que han estado en contacto con la madre a nivel intestinal, en particular se ha demostrado protección contra *Vibrio cholerae*, *E. coli enterotoxigénica*, *Campilobacter*, *Shigella* y *Giardia lamblia* (Cruz et al., 1988; Ruiz-Palacios et al., 1990; Walterspiel et al., 1994).

En la leche también hay células maternas, principalmente en el calostro, incluyendo macrófagos, linfocitos T y plasmocitos productores de IgA que continuarían su producción en el niño (Goldman, 1993; Brandtzaeg, 2003).

1.3.2. Los componentes bioactivos y la inmunoregulación

La capacidad de las células inmunes para discriminar y responder de manera adecuada a los antígenos de diverso origen y variable patogenicidad recae sobre una pequeña señalización inmunomoduladora de proteínas conocidas como citoquinas (López-Álvarez, 2007).

Existen numerosos factores de crecimiento y citoquinas presentes en la leche que cumplen funciones de inmunomodulación, y que en conjunto contribuyen a la maduración del intestino, del sistema inmune local y la colonización por la microbiota. Además, participan en el desarrollo de los mecanismos de tolerancia inmunológica en el lactante. Hay estudios epidemiológicos recientes que apoyan la idea de que la lactancia también tendría un rol protector frente al desarrollo de patologías autoinmunes como diabetes tipo 1 (Holmberg et al., 2007), enfermedad celíaca (Akobeng et al., 2006) y alergias (Greer et al., 2008).

La tolerancia es un proceso activo, los estudios realizados in vitro sugieren que los antígenos de la dieta presente en la leche materna junto con las citoquinas inmunosupresoras (IL-10 y TGF- β) ayudan en la promoción de la tolerancia a la dieta y antígenos de la microflora (Brandtzaeg et al., 1991).

La leche contiene citoquinas anti-inflamatorias, implicadas en procesos de regulación, en particular TGF- β (Factor β transformador de crecimiento) e Interleuquina 10 (IL-10), las cuales tienen como sitio común de acción el tracto gastrointestinal y al sistema inmune (Goldman, 2000).

El TGF- β tiene su origen en los monocitos, fibroblastos y células endoteliales, contribuye al desarrollo y diferenciación del epitelio intestinal y probablemente juega un papel en la reparación del tejido in vivo, ya que ha demostrado mejorar la re-epitelización de heridas in vitro mediante la estimulación de la migración de las células dañadas por citoquinas o infección que no se dividen en la anomalía (Playford et al., 2000; McPherson & Wagner, 2001).

Los bajos niveles de TGF- β sintetizado en el intestino del lactante son compensados por el aporte en altas concentraciones presente en la leche materna (Penttila et al., 1998), donde sus niveles a su vez no se correlacionan con los plasmáticos, permaneciendo incierta aún la identificación de su fuente de producción. Se han identificado tres isómeros siendo la TGF- β 2 el compuesto mayoritario en la secreción láctea (Prokesova et al., 2006).

El TGF- β presente en leche de humanos y en los animales, sobrevive el paso a través del intestino, siendo tomada rápidamente por el intestino delgado del neonato (Letterio et al., 1994), lo que sugiere que esta proteína puede influir en la inmunidad más allá del intestino estando implicada en la regulación inmune, regulando a la baja la inflamación. Lo cual apoya lo expresado por Kalliomaki et al., (1999) en cuanto declara que el TGF- β está involucrado a su vez en la regulación de la respuesta inmune donde tiene un efecto crucial en dos partes esenciales del sistema inmune de la mucosa intestinal: producción de IgA e inducción de la tolerancia oral.

El factor de crecimiento “Epidermal Growth Factor” también está presente en grandes cantidades en el calostro y tiene efectos sobre la maduración intestinal y en particular su presencia se asocia con la prevención del desarrollo de enterocolitis necrosante en niños prematuros (Dvorak, 2010). En forma concertada con el TGF- β contribuyen en el mantenimiento de la integridad intestinal (Lawrence & Pane, 2007).

La IL-10 es una citoquina con potente efecto inmunosupresor, se encuentra en la leche materna y es producida por las células mamarias, pero también está presente en los linfocitos y macrófagos de la leche (Bottcher et al., 2000).

Mientras que la IL-10 posee como principales efectos la inducción de la proliferación de algunas células T y potencia la proliferación de mastocitos inducida por la IL-3, a su vez amortigua la respuesta Th1, lo cual inhibe la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Goldman, 2000; Garofalo, 2010).

Los anticuerpos además de cumplir una función central en las defensas contra patógenos, participan en mecanismos de tolerancia inmunológica. La IgA neutraliza antígenos potencialmente alergénicos reclutando así la exposición del sistema inmune del lactante y minimizando respuestas alérgicas (Machtinger & Moss, 1986). Por otra parte, la IgG al complejear antígenos que ingresan por leche facilitarían su captación por las células presentadoras de antígeno del intestino que median mecanismos de tolerancia (Mosconi et al., 2010).

En suma, el potencial tolerogénico de la leche está condicionado en parte por el contenido de citoquinas inmunoregulatoras como el TGF- β e IL-10 así como el repertorio de antígenos e inmunocomplejos que la madre presente en la leche.

A continuación, se resumen algunas de las principales ventajas de la leche humana sobre el recién nacido: Mayor protección inmunológica, sobre todo para las infecciones intestinales. Se han observado muy pocas crisis diarreicas (Dewey et al., 1995) siendo los casos de enterocolitis necrotizante, muy escasos (Mc Guire & Anthony, 2003).

Menor frecuencia de infecciones respiratorias debido a que la inmunidad está aumentada (Jiménez 2001). En general la inmunidad aumenta de forma proporcional a la intensidad y duración de la lactancia (Lawrence & Pane, 2007).

Efecto protector contra enfermedades alérgicas y menor riesgo de sensibilización alérgica por el carácter homólogo de las proteínas de la leche humana (Jiménez 2001).

Posible reducción en el riesgo de enfermedades autoinmunes, como diabetes mellitus tipo I (Gerstein, 1994).

1.4. Efectos de la pasteurización sobre los componentes con actividad inmunológica de la leche humana

La leche humana ordeñada destinada al consumo de recién nacidos, particularmente los internados en Unidades de Terapia Intensiva, no debe presentar microorganismos en cantidad o calidad capaces de representar agravios a la salud. De esta forma, es preciso que se disponga de procedimientos capaces de asegurar la calidad sanitaria de la leche humana ordeñada.

El procesamiento de pasteurización recomendado actualmente y más utilizados en los BLH (Holder) para eliminar los principales patógenos antes de la distribución de la leche donada para consumo, consiste en un método lento y moderado de incubación en baño de agua a una temperatura de 62.5°C durante un tiempo de 30 minutos (Arslanoglu et al., 2010).

La pasteurización representa una alternativa eficaz, conocida hace mucho y practicada en el campo de Tecnología de Alimentos. Se trata de un tratamiento térmico aplicable a la leche humana que adopta como referencia la inactividad térmica del microorganismo más termorresistente, la *Coxiella burnetti*. Una vez observado el binomio temperatura de inactividad y tiempo de exposición capaz de desactivar ese microorganismo, se puede asegurar que los demás patógenos también estarán térmicamente inactivos.

Aunque el método muestra un buen compromiso entre la seguridad microbiológica y la calidad nutricional (Hartmann et al., 2007), también es conocido el efecto deletéreo que tiene sobre algunos componentes de la leche con actividad biológica incluyendo la flora normal y la desventajas de la pasteurización en la destrucción de plasmocitos y linfocitos T de la leche (Lawrence, 1999).

A su vez, varios autores han analizado los efectos de este tratamiento sobre los macronutrientes y micronutrientes con efectos biológicos; los resultados que fueron sintetizados en una revisión reciente (Ewaschuk et al., 2011) muestran que varios de los componentes implicados en las defensas son afectados de diversas maneras.

Los plasmocitos incrementan los anticuerpos dirigidos contra patógenos específicos a los que la madre ha sido expuesta, y los linfocitos T atacan a las células afectadas y activan sistemas de defensa inmune.

A pesar de esta pérdida de células, existen otros compuestos protectores que son afectados mínimamente o incluso que no resultan afectados por la pasteurización (Tully, et al., 2001).

Las IgA y IgAs que constituyen la mayor parte de los anticuerpos de la leche humana, mantienen su actividad respecto a la leche fresca entre un 67% y un 100% después de su pasterización (Ford et al., 1977; Evans et al., 1978), reduciéndose tal actividad hasta un 38-65% en muestras de calostro pasteurizado (Koenig et al., 2005).

El estudio realizado por Koenig et al., (2005) demostró que la actividad de estas inmunoglobulinas en muestras de calostro pasteurizado respecto al calostro fresco era de un 65% en aquellas mujeres con periodos de gestación inferiores a 32 semanas, de un 44% en mujeres con un periodo de gestación entre 32 y 36 semanas, y de un 38% en mujeres con periodos de gestación mayor o igual a 37 semanas.

2. Objetivos

El objetivo general es conocer la composición de los calostros donados en el BLH que son destinados a la alimentación de prematuros, como forma de adoptar mejores criterios de valoración que contemplen propiedades inmunológicas además del aporte nutricional, que permitiría disponer de lotes con un balance óptimo del aporte calórico e inmunológico para cada situación, de acuerdo a los criterios médicos.

Además, se pretende estudiar los efectos de la pasteurización de Holder sobre los componentes bioactivos para valorar la necesidad de optimizar el procedimiento ó plantear métodos alternativos para obtener lotes de calostro con máximo contenido de componentes bioactivos.

Los objetivos específicos planteados son los siguientes:

- Describir la variación temporal en la composición de proteínas totales y los principales componentes con propiedades inmunológicas en calostros donados durante la primer semana post parto.
- Desarrollar un método aplicable en forma rutinaria a los lotes de calostros para valorar comparativamente el aporte proteico.
- Evaluar si existe correlación entre el aporte proteico y calórico en cada lote de calostro.
- Desarrollar métodos de ELISA para determinar el contenido de las principales inmunoglobulinas secretadas en calostro con acción en las defensas, IgA e IgM.
- Desarrollar métodos de ELISA para determinar el contenido de las principales citoquinas secretadas en calostro con actividad inmunoreguladoras como TGF- β 2 e IL-10.
- Evaluar los efectos de la pasteurización sobre el contenido proteico, de inmunoglobulinas y citoquinas con efectos inmunoreguladores.
- Finalmente, en base a los resultados obtenidos se pretende evaluar en una etapa inmediatamente posterior, la posibilidad de implementar a la rutina de trabajo del BLH las técnicas desarrolladas que resulten más adecuada.

3. Materiales y Métodos

3.1. Población y muestras de estudio

Se analizó un total de 67 muestras de calostros individuales, provenientes de madres saludables con gestación a término, representativos de un panel de 100 calostros donados en el periodo setiembre 2012 - setiembre 2013 en el Banco de leche Humana "Dr. Ruben Panizza" ubicado en el Centro Hospitalario Pereira Rossell (BLH-CHPR).

Las donantes brindaron su excedente de producción de acuerdo a los criterios de inclusión para ser donante del BLH (Anexo 8.1) y mediante consentimiento informado (Anexo 8.2) accedieron a que una fracción del volumen donado fuera destinado al presente estudio de investigación, aprobado previamente por el comité de ética del CHPR.

El volumen restante de cada muestra fue tratado según el protocolo de trabajo del banco, siendo destinado en su mayoría a la alimentación de los recién nacidos de bajo peso.

Cada muestra correspondió a un pool de por lo menos 3 extracciones realizadas durante un día, conservadas por congelación a -20°C hasta su procesamiento. Para el estudio se utilizó un volumen total de 12 mL distribuidas en las dos fracciones: calostro crudo (AP) y calostro pasteurizado (DP). A su vez estas muestras fueron alicuotadas (1 mL) y conservadas (Ewaschuk et al., 2011; Souza et al., 2014) en el laboratorio de inmunología a -80°C, con la intención de evitar múltiples ciclos de congelado/descongelado que alteren el análisis de los componentes bioactivos.

3.2. Procesamiento de los calostros en el BLH

Luego que se obtuvieron las muestras destinadas al trabajo experimental, su procesamiento y los correspondientes análisis que se describen a continuación, se realizaron siguiendo los protocolos de trabajo del BLH de acuerdo a las normas establecidas por la Rede BLH-BR/Fiocruz; Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevencao E Controle De Riscos. Brasilia - 2008, www.Redebhl.fiocruz.br

3.2.1. Análisis Físicoquímicos

3.2.1.1. Análisis organoléptico

Es el inicio dentro de una serie de diferentes análisis que conforman el control de calidad realizado a las leches donadas en el BLH y describe las características macroscópicas basada en el aspecto, color y olor. Un resultado anormal en alguno de estos parámetros refleja la alteración de la muestra y debe ser descartada como medida de seguridad, mientras que un resultado considerado normal o aceptable permite continuar con la determinación de la acidez Dornic (°D).

3.2.1.2. Acidez Dornic

Se basa en un método de valoración ácido-base, que permite determinar la acidez titulable de la leche expresada en grados Dornic, considerando que cada 0,01 mL que gaste de NaOH 0.1N (solución Dornic) para neutralizar 1 mL de leche humano ordeñado se corresponde a 1°D (un grado Dornic). Se realiza por triplicado y el valor que se considera aceptable es menor a 8°D para poder continuar con el procesamiento de las muestras mediante la pasteurización de Holder; un resultado igual o mayor a 8°D se considera alterado e implicado tener que descartar la muestra.

3.2.1.3. Contenido energético

Se determinó mediante la técnica del crematocrito (Lucas et al., 1978), la cual permite estimar el contenido energético en la leche humana cruda en base al contenido de lípidos. Se calentó cada muestra entera a baño maría a 40°C durante 10 minutos y se homogeneizó con un agitador tipo Vortex®. De cada muestra se extrajeron para realizar el crematocrito por triplicado capilares de 75 mm de longitud x 1.5 mm de diámetro que contienen aproximadamente 60 µL, sellados en un extremo y se centrifugaron durante 15 min a 15.000 rpm en una centrífuga Jouan HEMA-C para hematocrito. Luego se midió con una regla milimetrada la distancia (d) ocupada por la fracción de menor densidad (crema o grasa) y el total de la muestra (ver Figura 1A). El crematocrito se expresó como el porcentaje de crema con respecto a la longitud total de la columna de muestra (ver Figura 1B). Se calculó la media de los crematocritos y, mediante “la fórmula de Lucas et al.,1978” se determinó el contenido energético de las muestras expresado en kcal/L (ver Figura 1C).

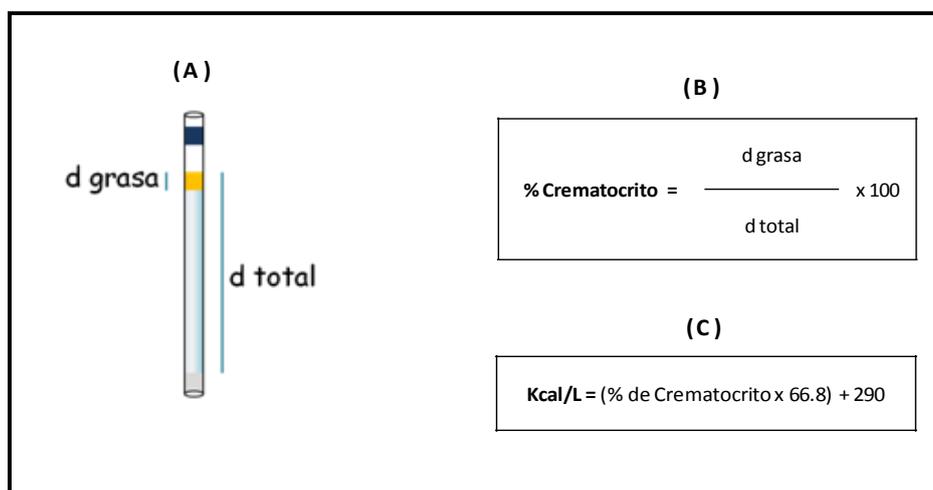


Figura 1. Contenido energético obtenido mediante la técnica del crematocrito. (A) representación esquemática donde se muestra la fracción de crema (d grasa) y la fracción total de la muestra (d total) luego de la centrifugación. (B) expresión matemática utilizada para calcular el porcentaje de crema. (C) Fórmula de Lucas et al., (1978) utilizada para calcular el contenido energético (kcal/L).

3.2.2. Pasteurización de Holder y validación microbiológica

La pasteurización de Holder consiste en el tratamiento térmico de las muestras de leche donadas, que fue realizado en la pasteurizadora (DEXIN) a una temperatura de 62.5°C durante un tiempo de 30 minutos en baño de agua, con el objetivo de inactivar la totalidad de los microorganismos patógenos (Almeida et al., 2005). Culinado el proceso la leche se enfrió rápidamente para volver a entrar en la cadena de frío y posteriormente se obtuvieron las alícuotas correspondientes a las muestras definidas como "DP" y realizó el control microbiológico. Este control consiste en la inoculación de 4 mL representativos de la muestra obtenida de diferentes zonas del frasco (3 superficiales y una profunda) en un tubo que contiene el medio de cultivo líquido Bili Verde Brillante al 2% de lactosa de concentración 50 g/L y presenta en su interior un tubo Durham invertido, luego se incubó durante 48 hs a 36°C, mientras que las muestras en estudio se congelan a -20°C y se las mantiene en estado de cuarentena hasta la interpretación de los resultados.

La presencia de gas obtenido dentro del tubo Durham señala un resultado positivo que evidencia crecimiento bacteriano por lo que la muestra debe ser descartada, mientras que la ausencia de gas se corresponde con un resultado negativo que permite liberar la muestra del estado de cuarentena para su utilización. Por lo que este análisis permite evaluar individualmente cada muestra con el fin de validar el proceso de pasteurización y garantizar su seguridad alimentaria.

3.3. Obtención de la fracción acuosa del calostro

La determinación de proteínas totales y de los componentes inmunológicos de naturaleza proteica se realizó en la fracción de la leche exenta de los componentes lipídicos y celulares (denominada fracción acuosa) obtenido mediante centrifugación a 10900g durante 10 minutos de las muestras mantenidas en frío.

Por otra parte la mayor parte de las inmunoglobulinas y de las citoquinas a determinar se concentran en la fase acuosa (López-Álvarez, 2007), por lo que la concentración de estos componentes en esta fase se considera una buena estimación del aporte en leche que recibe el lactante.

Tras la visualización de las tres fases bien definidas en cada muestra (lípidos en fase superior y pellet conteniendo células y partículas, ver Figura 2), se tomó cuidadosamente una alícuota de la fracción acuosa con un tip, evitando la contaminación con la fase lipídica superior.

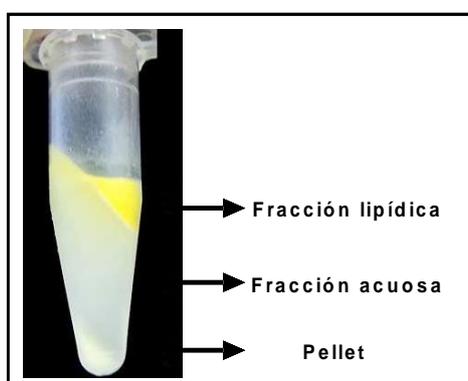


Figura 2. Fotografía de una muestra de calostro obtenida luego de centrifugación en frío a 10900g durante 10 minutos, donde se observan las tres fases correspondiente a: fracción lipídica (superior), fracción acuosa (media) y pellet celular (inferior).

3.4. Cuantificación de proteínas totales

La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó en la fase acuosa de los calostros mediante la utilización de los métodos de Bradford (Bradford, 1976) y Absorción UV a 280/260 nm ($A_{280/260}$) (Aitken & Learmonth, 2002).

3.4.1. Método de Bradford

El método se basa en la unión de un colorante (*Comassie Blue G-250*) a las proteínas, formando un complejo coloreado (Bradford, 1976). Posee las ventajas de ser muy sensible, simple, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Para minimizar el volumen de muestra se adaptó a microplacas. La fracción acuosa de cada muestra se valoró mediante 4 diluciones seriadas al medio desde 1/30. La reacción se realizó agregando un volumen de 10 μ L de muestra y 200 μ L del reactivo de Bradford (preparado a partir de 12.5 mL de Comassie Blue G-250 0.2% en etanol 95%, 25 mL de Acido Fosforico 85% y agua csp 250 mL), posteriormente se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, para luego medir a 595 nm la formación del complejo mediante la utilización de un espectrofotómetro de placas (*LabSystems Multiskan MS*). Se utilizó como estándar la fracción acuosa de una leche madura valorada previamente por el método de referencia para determinación de proteínas (Kjeldahl) en el laboratorio de la cátedra de Ciencia y Tecnología de los alimentos (Facultad de Química).

3.4.2. Absorción UV ($A_{280/260}$)

El método se basa en la medida de absorción UV de la fracción acuosa de la muestra a 280 nm (siendo esta longitud de onda el pico de absorción de los grupos aromáticos presentes en algunos aminoácidos) y 260 nm (corrección por la interferencia de ácidos nucleicos) (Aitken & Learmonth, 2002). Para minimizar el volumen de muestra a utilizar (2 μ L), se utilizó el equipo NANO DROP 1000 Spectrophotometer (*Thermo Scientific*) realizando determinaciones por duplicado y buffer fosfato salino 1X, pH=7.4 (PBS 1X) como blanco.

La absorbancia, fue corregida mediante la utilización de la siguiente “fórmula matemática descrita por Aitken & Learmonth, 2002”:

$$\text{Proteína (mg/mL)} = (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260})$$

3.5. Método de ELISA para determinación de compuestos bioactivos

Se describen las etapas generales para los diferentes ELISA de captura utilizados:

_ Sensibilización de placas de microtitulación mediante soluciones de anticuerpos específicos para el componente bioactivo a evaluar ó determinar, sembrando 100 μL /pozo e incubando en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C.

_ Bloqueo mediante soluciones de buffer bloqueante, sembrando 200 μL /pozo e incubando en cámara húmeda durante 1 hora a 37°C (a temperatura ambiente para IL-10)

_ Dilución de las muestras, controles internos y estándares, utilizando soluciones con matriz y buffer correspondientes. Se sembraron 100 μL /pozo en cámara húmeda e incubación durante toda la noche a 4°C.

_ Detección mediante anticuerpos específicos conjugados a peroxidasa en buffer de dilución correspondiente a la concentración óptima recomendada por el fabricante. Se sembraron 100 μL /pozo e incubaron en cámara húmeda durante 1 hora a 37°C (a temperatura ambiente para IL-10).

_ Lavados en todas las etapas intermedias, utilizando buffer PBS 1X conteniendo 0.05% de Tween-20 (PBS-T) por triplicado durante 3 minutos. Luego de la etapa de conjugación se agrego un lavado final con PBS 1X durante 5 minutos.

_ Revelado de la unión específica mediante solución compuesta por: 12 mL de Acetato de Sodio 0.1M (pH=5.5), 200 μL de 3,3', 5,5'- tetrametilbencidina (*TMB*) 6 mg/mL en dimetilsulfóxido y 50 μL de H_2O_2 1%, sembrando 100 μL /pozo e incubando a la oscuridad durante 15 minutos. La reacción se detuvo utilizando un volumen de 50 μL /pozo de una solución 1M de H_2SO_4 .

_ Lectura de la densidad óptica medida a 450 nm en un espectrofotómetro de placas de ELISA (*LabSystems Multiskan MS*).

3.6. Determinación de Anticuerpos IgA e IgM Totales

Para la determinación de la concentración de las inmunoglobulinas IgA e IgM totales, se diseñaron respectivos métodos de ELISAs de captura, utilizando placas de microtitulación de alta adherencia (*Greiner bio-one*) y una combinación adecuada de anticuerpos comerciales, adsorbido en la placa y anticuerpos acoplados a peroxidasa de rábano para la detección.

La sensibilización de las placas se realizó con 10 µg/mL de anti-hIgA (α chain) y anti-h Immunoglobulin (*Sigma*) (ambos producidos en cabra) en PBS 1X para detección de IgA e IgM respectivamente.

Luego se bloqueó con PBS 1X conteniendo albúmina de suero bovino (BSA) 1% (PBS-BSA 1%).

Posteriormente se procedió a realizar las diluciones correspondientes utilizando PBS-T-BSA 1%. Las muestras se incubaron a partir de 4 diluciones seriadas al medio, en un rango de concentraciones que previamente se verificó que no se encontraran en condiciones de saturación, desde 1:30000 y 1:200 para IgA e IgM respectivamente. Se utilizaron estándares comerciales derivados de suero humano (*N Protein Standard SL, Siemens*) para expresar las concentraciones de IgA e IgM en los calostros; los estándares específicos utilizados para elaborar la curva de calibración se sembraron por duplicado en 8 diluciones seriadas al medio a partir de 1/20000 (IgA stock 1.92 g/L) y 1/2000 (IgM stock 0.639 g/L).

Por otra parte, se utilizaron controles internos (*N/T Protein Control SL/M, Siemens*) para validar las condiciones del experimento sembrando 4 diluciones seriadas al medio desde 1/60000 (IgA stock 2.34 g/L) y 1/20000 (IgM stock 1.04 g/L).

Luego se incubó una dilución recomendada por el fabricante (1/5000) de los anticuerpos conjugados a peroxidasa anti-hIgA(α chain)-HRP (*Sigma, A-0295*) y anti-hIgM (µ chain)-HRP (*Sigma, A-4290*) (ambos producidos en conejo) en PBS-T-BSA 1% para IgA e IgM respectivamente.

Se verificó previamente que en el rango de diluciones de trabajo de las muestras, los anticuerpos específicos contra BSA eventualmente presentes en los calostros no interfirieran con el ensayo.

3.7. Determinación de citoquinas

Las concentraciones de las citoquinas TGF- β 2 e IL-10 se determinaron por duplicado en la fracción acuosa de las muestras de calostros, por medio de ELISA de captura mediante la utilización de los correspondientes reactivos comerciales y el empleo de microplacas de titulación de óptimo pegado (*Maxisorp*, *NUNC*).

3.7.1. TGF- β 2

Su concentración se determinó utilizando “*DuoSet[®]ELISA Development System*”(R&D Systems), a partir de la activación previa de la citoquina mediante un pretratamiento de la muestra en medio ácido según las indicaciones del fabricante (límite de detección: 31.25 pg/mL)

3.7.2. IL-10

Su concentración en las muestras se determinó a partir de la fracción acuosa, diseñando un ELISA de captura mediante ajustes en las condiciones de incubación y concentraciones originales de los reactivos provistos en el set comercial “*BD OptEIA[™]; Set Human IL-10*”(BD Bioscience) con el propósito de aumentar la sensibilidad de la técnica (límite de detección: 7.8 pg/mL).

La sensibilización de las microplacas se realizó con una dilución 1/150 de anticuerpos de captura anti-(IL-10 humano) en buffer carbonato pH=9.5 (Untalan et al., 2009).

Luego se bloqueó con PBS 1X conteniendo suero fetal bovino (SFB) al 10% (PBS-SFB 10%).

Posteriormente se realizó la incubación de la fracción acuosa de las muestras puras, mientras que la IL-10 recombinante utilizada como estándar específico para elaborar la curva de calibración se realizó por duplicado mediante 8 diluciones seriadas al medio a partir de 500 pg/mL en buffer PBS-SFB 10% y reconstituido en la fracción acuosa de un calostro (dpp=5) donde previamente no se detectó IL-10, que fue utilizado como buffer para estudiar la existencia de efecto matriz.

La detección, se realizó con anticuerpos anti-(IL-10)-Biotinilado en dilución 1/300 con Streptavidina conjugado a peroxidasa (SAV-HRP) en dilución 1/250 en PBS-SFB 10%.

3.8. Expresión de resultados y tratamiento estadístico

Los resultados de las muestras problema se calcularon en base a curvas de calibración realizadas con soluciones estándares comerciales correspondientes para cada ensayo.

Para el análisis de la evolución temporal de los diferentes componentes, se realizó una clasificación arbitraria de los calostros, basados en las características altamente dinámicas que presenta la composición de la leche humana, definidos en tres grupos de acuerdo al día post parto (dpp) en que se realizó la extracción materna: calostro temprano (1-2; n=13), calostro intermedio (3-5; n=45) y calostro tardío (6-7; n=9).

La descripción de las variables cuantitativas, contenido energético (kcal/L) y proteínas totales en base a la distribución normal que presentan, se expresaron como el promedio y desvío estándar (Mayans & Martell., 1999).

Teniendo en cuenta que está reportado en la bibliografía (Espinosa-Martos et al., 2013), que la concentración de Inmunoglobulinas y citoquinas encontrados en las muestras de calostros no presentan una distribución normal se utilizaron tests estadísticos no paramétricos y los resultados se expresaron como medianas y rangos.

El análisis estadístico se realizó utilizando el *Test de Mann-Whitney U* para muestras no pareadas en la comparación de parámetros entre los diferentes grupos y el *Test Wilcoxon matched-paires signed rank* para muestras pareadas, para evaluar los efectos de la pasteurización. El análisis de correlación entre variables se realizó mediante el *Test de Pearson*. Todos los test se realizaron utilizando el programa *GraphPad Prism 5.0*.

En cada uno de los gráficos, las diferencias estadísticamente significativas entre dos grupos se representaron con una línea continua y con un símbolo según el nivel de significancia: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4. Resultados

4.1. Contenido energético

La grasa es el componente más variable de la leche. Varía a lo largo del día e incluso dentro de una misma lactada, aumentando hacia su final. Proporciona entre el 50 y 60% del valor calórico. En general los valores más bajos se encuentran en el calostro, incrementando paulatinamente su valor durante la lactancia acompañando las demandas energéticas del lactante generadas durante su desarrollo.

Se determinó mediante la técnica del crematocrito descrito por Lucas et al., (1978). Donde al ser un método indirecto para estimar el contenido energético, los resultados fueron expresados en kcal/L en función de una fórmula matemática a partir del uso de factores de conversión al considerar el aporte de otros nutrientes presentes en la muestra.

La Figura 3 muestra los valores obtenidos para los calostros analizados en función del tiempo de extracción. A los efectos de la aplicación de test estadísticos se clasificaron los calostros en base al día post parto (dpp) al que corresponde en tres grupos representativos de calostros tempranos (1-2 dpp), intermedios (3-5 dpp) y tardíos (6-7 dpp). El contenido proteico y energético de los calostros durante la primer semana post parto refleja la variabilidad existente en la composición durante el transcurso del tiempo con un marcado descenso a partir del sexto dpp (ver Figura 3A).

En la Figura 3B se muestra que no hay diferencias significativas del contenido energético durante la primer semana post parto, aunque se observan una ligera tendencia a disminuir con el transcurso de los dpp presentando valores de: 686 ± 136 ; 673 ± 96 ; 619 ± 48 kcal/L para los tres grupos respectivamente. Mientras que el valor global para el panel de calostros acorde con lo esperado, presentó bajo nivel de calorías (668 kcal/L).

4.2. Contenido proteico

La leche es un fluido altamente complejo, que contiene la fracción lipídica dispersa como glóbulos de la leche, y la fracción proteica en solución y dispersión coloidal (micelas de caseínas). Si bien los glóbulos de grasa transportan cierta cantidad de proteínas (Cavaletto et al., 2008), la fracción mayoritaria de proteínas se encuentra en la fase acuosa que se obtiene luego de centrifugar y separar la fracción lipídica de menor densidad. Por este motivo y en base a la metodología disponible a nivel del laboratorio de inmunología, nos propusimos aplicar alguno de los métodos rápidos y que requieren muy poco volumen de muestra para valorar proteínas, que a su vez tuviera la potencialidad de ser implementado en el laboratorio del BLH-CHPR, en contraste al método de referencia (Kjeldahl), que es complejo y consume un volumen considerable de muestra.

4.2.1. Evolución con el tiempo

Como se observa en la Figura 3C, los resultados comparativos del contenido proteico de los calostros durante la primer semana post parto muestran que no existen diferencias significativas, presentando una concentración promedio de 11.9 ± 3.1 g/L y alcanzando su máxima concentración en los primeros dpp, similar a lo reportado por otros autores (Shi et al., 2011).

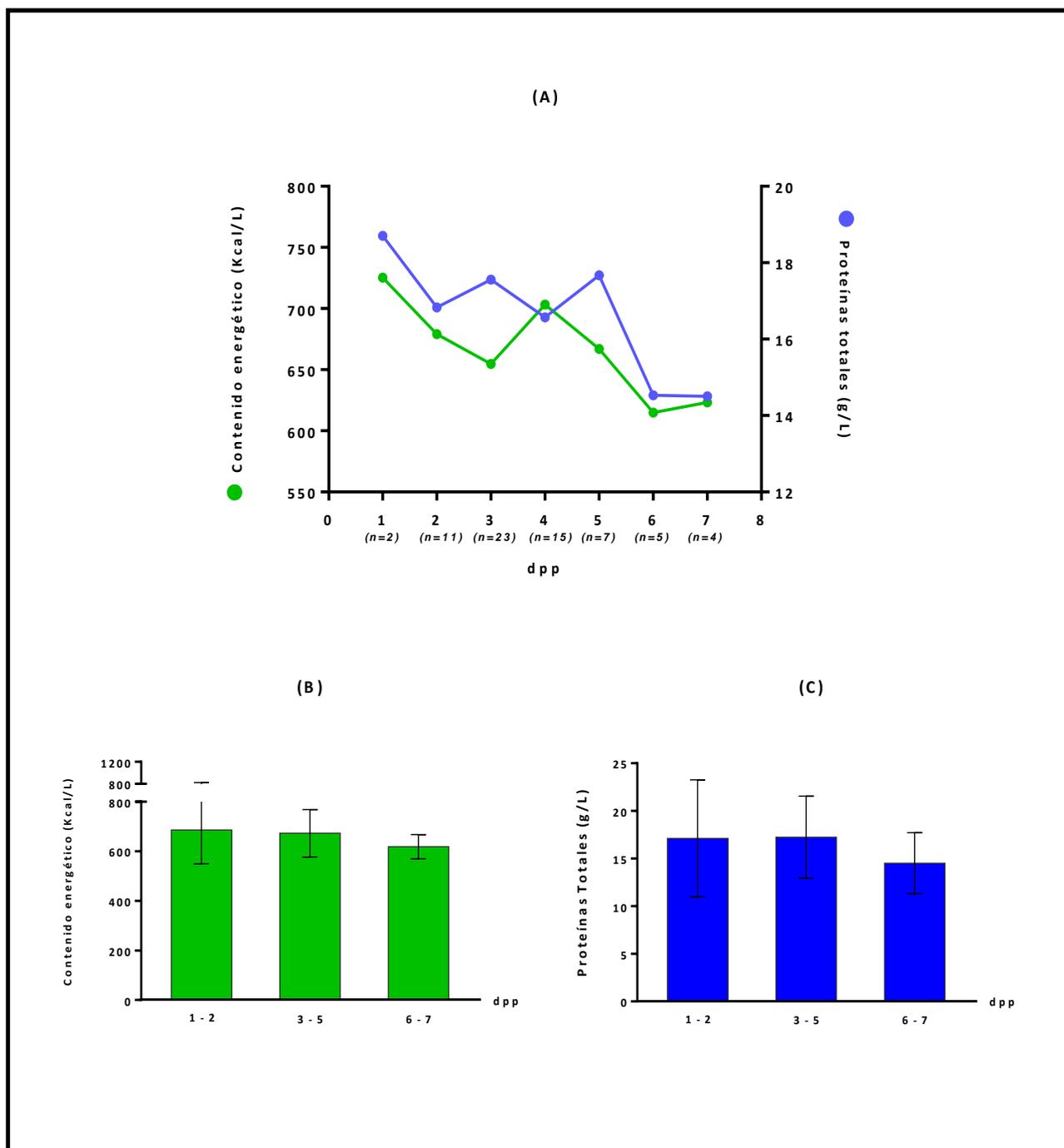


Figura 3. Evolución del contenido energético y proteico del panel de calostros crudos (AP) durante la primer semana de lactancia. (A) dinámica del contenido energético (kcal/L) y proteínas totales (g/L) para cada día post parto (dpp). (B) evolución del contenido energético (kcal/L) por grupos definidos según los respectivos dpp. (C) evolución del contenido proteico (g/L) por grupos definidos según los respectivos dpp. Los datos se representan como el promedio de los valores obtenidos en cada caso y las barras indican los desvíos estándar. Se representó con “n” a la cantidad de muestras correspondiente a cada dpp.

En la Figura 4A se confirma que durante los primeros 5 dpp no ocurren cambios significativos, sin embargo se produce una disminución significativa del calostro pasteurizado a partir del sexto dpp ($p < 0.05$). Este hallazgo confirma el marcado descenso observado anteriormente donde se representó la evolución de los calostros por dpp durante la primera semana de lactancia (ver Figura 3A). Si bien el período de estudio que comprende el calostro es muy breve, este resultado coincide con la tendencia al descenso del contenido proteico durante el período de lactancia (Ballard & Morrow., 2013).

Como ya se menciona, la valoración proteica se realizó mediante el método de Bradford, empleado anteriormente por distintos autores. Pero a su vez se implementó la determinación en paralelo por el método de Absorción UV ($A_{280/260}$), el cual fue previamente contrastado contra el método de referencia (Kjeldahl), mediante la valoración de una muestra de leche madura logrando reproducir similares resultados entre ambos. Posteriormente se compararon los métodos de Bradford y Absorción UV ($A_{280/260}$) (ver Figura 4C), logrando establecer una muy buena correlación representada por el coeficiente de Pearson ($r = 0.5796$) y resultando significativa ($p < 0.0001$).

4.2.2. Efectos de la Pasteurización

Como se muestran en las Figuras 4A y 4B, el contenido proteico de los calostros mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) producto de la pasteurización a nivel global, que son evidentes en los calostros intermedios (3-5 dpp; $n = 45$). Las diferencias obtenidas se deben al aumento en la concentración luego de la pasteurización.

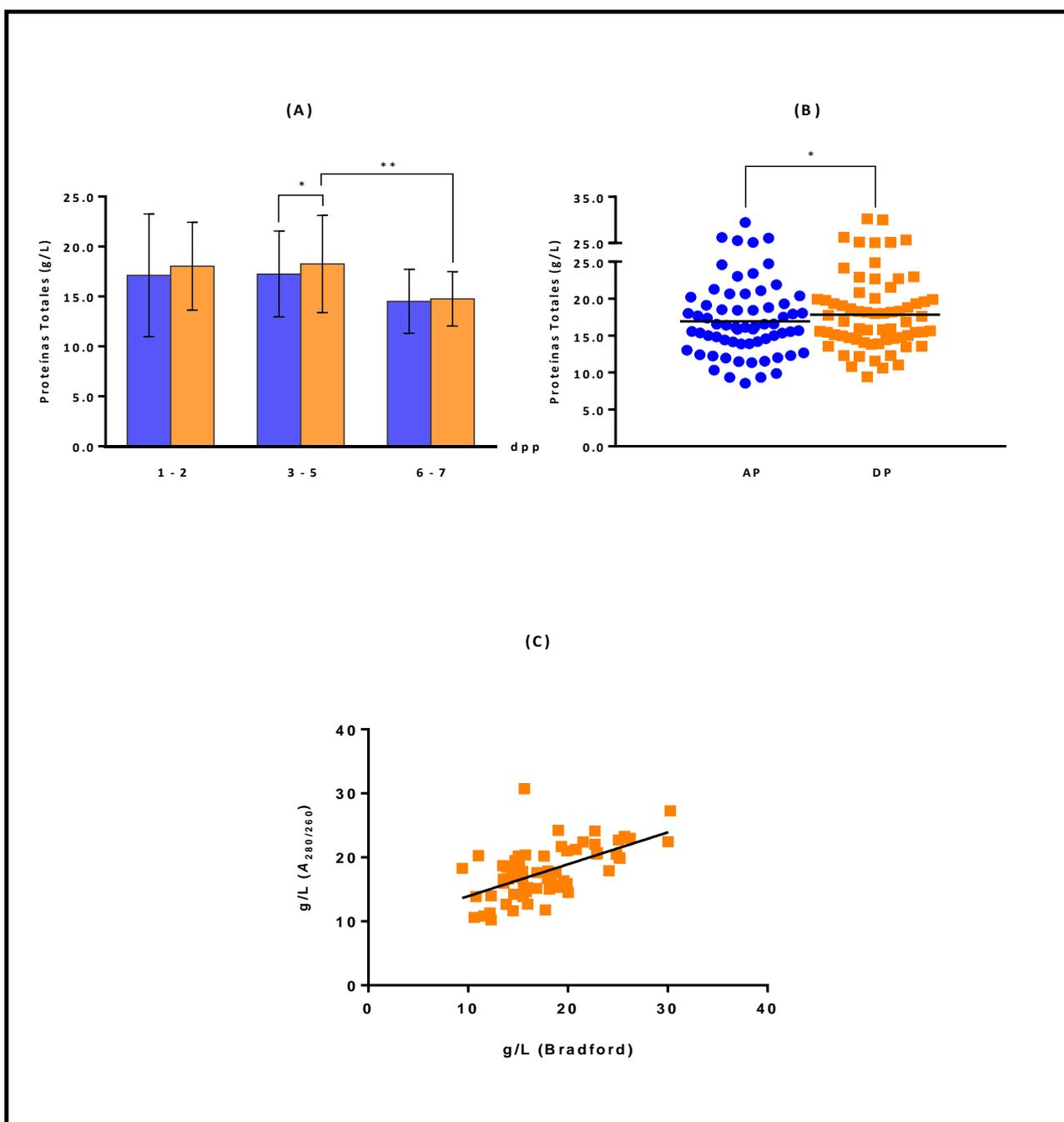


Figura 4. Contenido proteico de los calostros de la primer semana de lactancia. (A) evolución de la concentración de proteínas totales (g/L) por grupos definidos según los respectivos dpp y correspondiente determinación del efecto de pasteurización. **(B)** efecto global de la pasteurización sobre el panel de calostros en estudio. **(C)** correlación entre los métodos de Bradford y Absorción UV ($A_{280/260}$) aplicado sobre el panel de calostros pasteurizados (DP), obteniendo un coeficiente de Pearson $r = 0.5796$ ($p < 0.0001$). Las muestras crudas (AP) se indican con ■, mientras que las pasteurizadas (DP) se corresponden con ■. Los datos se representan como el promedio de los valores obtenidos y las barras indican los desvíos estándar respectivamente. Las diferencias estadísticamente significativas entre dos grupos se representaron con una línea continua y con un símbolo según el nivel de significancia: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.3. Inmunoglobulinas

Se determinaron mediante ELISA de captura, utilizando placas de alto adherencia y una combinación adecuada de anticuerpos comerciales.

Los valores de densidad óptica se graficaron en función de la concentración y se buscó la curva que mejor se ajustara a los datos experimentales obtenidos. La construcción de la curva de IgM se realizó en base a la relación lineal: Absorbancia vs. Ln (Conc. IgM).

A partir de la ecuación de la recta se calcularon las concentraciones correspondientes a cada muestra, teniendo en cuenta los valores que entraban en el rango de linealidad de la curva de calibración; 1.5 a 48 µg/L y 0.010 a 0.320 g/L para IgA e IgM respectivamente.

El método fue validado mediante la utilización de un control de calidad interno (N/T Protein Control SL/M, Siemens) con una concentración de IgA reportada por el fabricante de 2.34 g/L, obteniéndose una concentración promedio entre las placas realizadas (n=13) de 2.32 ± 0.30 g/L. Considerando aceptable un error del 15% de su valor nominal (rango de 1.99 a 2.69 g/L), el ELISA desarrollado fue adecuado para la determinación de IgA en los calostros. Mientras que la concentración de IgM reportada por el fabricante del control interno es de 1.04 g/L, obteniéndose una concentración promedio entre las placas realizadas (n=10) de 1.11 ± 0.30 g/L. Considerando aceptable un error del 15% de su valor nominal (rango de 0.88 a 1.20 g/L), el ELISA desarrollado fue adecuado para la determinación de IgM en los calostros.

4.3.1. Inmunoglobulina A

4.3.1.1. Evolución con el tiempo

La concentración de IgA en calostros crudos refleja gran variabilidad individual y una tendencia al descenso con los días, presentando su máxima concentración al segundo dpp (ver Tabla 1), similar a lo reportado recientemente por Castellote et al. (2011), aunque no registró diferencias significativas durante la primera semana post parto (ver Figura 5A).

Los niveles de IgA obtenidos en el panel de calostros analizados (1.30 g/L), fueron del orden de los reportados por otros autores (Tomicic et al., 2010; Shi et al., 2011; Souza et al., 2014). Confirmando que es la Inmunoglobulina mayoritaria, representando el 10% del total de proteínas, lo cual reafirma el rol que desempeña en la protección de los primeros días al proveer de inmunidad pasiva al recién nacido.

4.3.1.2. Efectos de la Pasteurización

Tanto la IgA total como la secretora han sido de los componentes más estudiados principalmente en leche madura y varios son los autores que han reportado pérdidas variables luego de la pasteurización.

Nuestros resultados permiten constatar que la pasteurización produce pérdidas significativas a nivel global, representadas en todos los grupos (ver Figuras 5A y 5B), correspondiente con un valor de pérdida calculado de un 22%, que también puede interpretarse como un porcentaje de retención del 78% de IgA en los calostros pasteurizados (ver Figura 7 y Tabla 3).

Los primeros trabajos realizados al respecto ya evidenciaban una pérdida de IgA del 20% (Ford et al., 1977). Sin embargo el trabajo de Evans et al., (1978) fue el único encontrado hasta el momento donde no obtuvieron pérdidas de IgA luego del tratamiento térmico. Trabajos más recientes como los de Permanyer et al., (2010) y Souza et al., (2014) informaron una pérdida significativa de IgA del 28% y 20% respectivamente, que coinciden con nuestros resultados que osciló entre 20-28%. Pérdidas más altas del 62% y 64% también han sido reportado por Koenig et al., (2005); Braga & Palhares (2007) y Viazis et al., (2007), respectivamente.

4.3.2. Inmunoglobulina M

4.3.2.1. Evolución con el tiempo

La concentración de IgM, también presentó su mayor concentración durante los primeros dpp para luego descender y alcanzar otro máximo hacia el quinto dpp (ver Figura 5C y Tabla 1), lo cual refleja la gran variabilidad individual que existe entre las diferentes muestras, aunque sin llegar a considerarse significativas respecto al transcurso de los dpp dentro del grupo calostro.

Respecto a la concentración global en el presente trabajo (0.045 g/L), fue intermedia respecto a la encontrada en la literatura según: Koenig et al., (2005) (0.014 g/L); Shi et al., (2011) y Souza et al., (2014) (0.120 g/L; 0.280 g/L, respectivamente), y que se represento como un porcentaje relativo menor al 1% (0.6 %) respecto a la concentración de proteínas totales.

4.3.2.2. Efectos de la Pasteurización

Aunque el comportamiento de la IgM frente al efecto de la pasteurización no ha sido tan bien estudiado como el de la IgA, se ha evidenciado que de acuerdo a su gran tamaño es la inmunoglobulina más inestable frente al tratamiento térmico (Ewaschuk et al., 2011).

Nuestras condiciones de pasteurización afectaron drásticamente el contenido de IgM, evidenciada por las pérdidas significativas a nivel global representada por todos los grupos (ver Figuras 5C y 5D), correspondiente con un valor de pérdida consistentemente alto calculado de un 83% (ver Figura 7 y Tabla 3).

En la literatura, se han reportado pérdidas moderadas y significativas cercanas al 51% según Souza et al., (2014) (AP=0.28 g/L, obtenida con calostro extraído en los primeros 4 dpp), mientras que pérdidas totales han sido reportadas según Ford et al., (1977) (AP= 0.10 g/L, trabajando con leche madura) y más recientemente por Koenig et al., (2005) (AP=0.014 g/L).

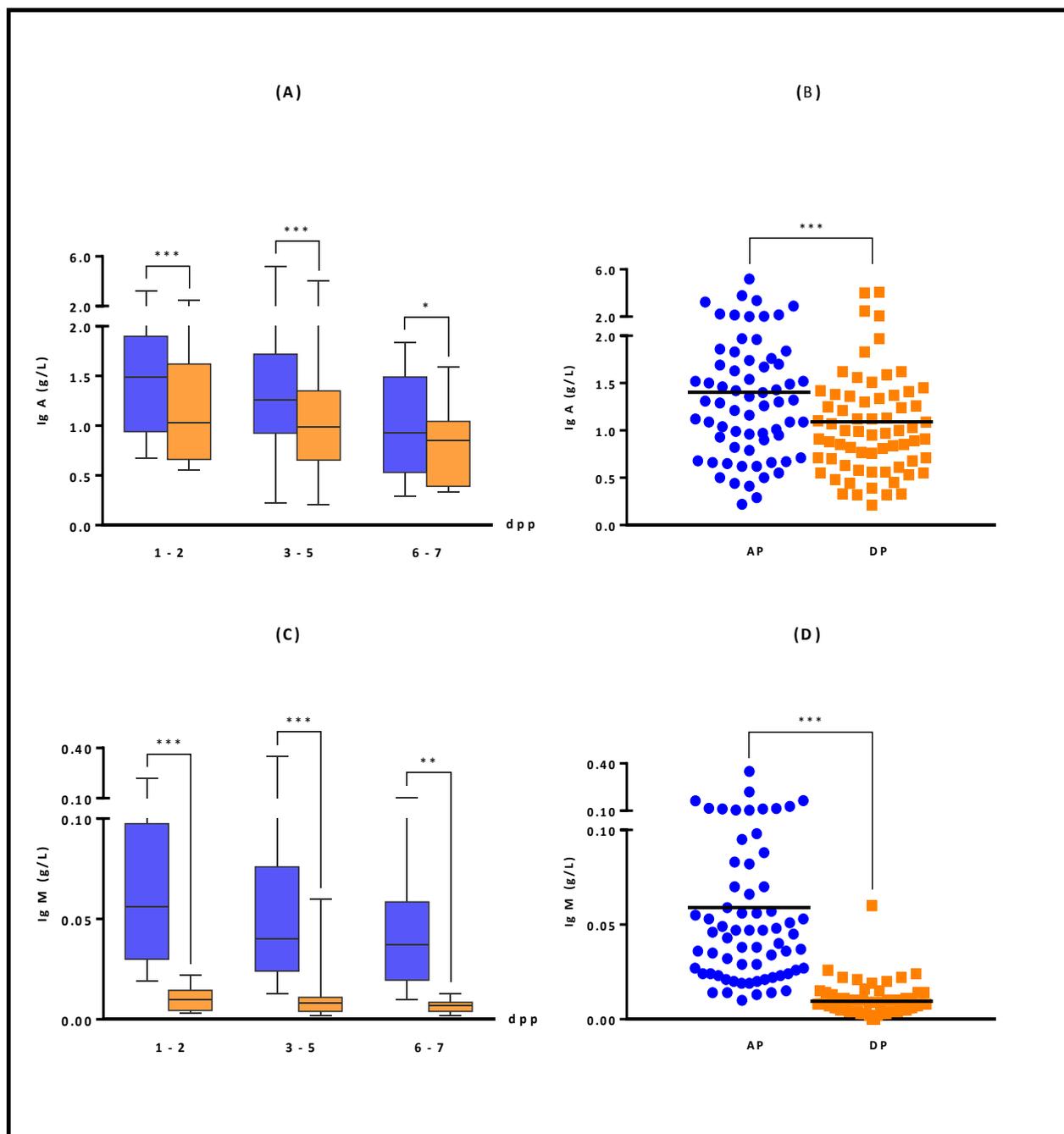


Figura 5. Inmunoglobulinas IgA e IgM y efectos de la pasteurización en calostros de la primer semana de lactancia. (A) evolución de la concentración de IgA por grupos definidos según los respectivos dpp y correspondiente determinación del efecto de pasteurización. (B) efecto global de la pasteurización sobre la IgA del panel de calostros en estudio. (C) evolución de la concentración de IgM por grupos definidos según los respectivos dpp y correspondiente determinación del efecto de pasteurización. (D) efecto global de la pasteurización sobre la IgM del panel de calostros en estudio. Las muestras crudas (AP) se indican con ■, mientras que las pasteurizadas (DP) se corresponden con ■. En (A) y (C) los datos se representan en diagramas de caja, en los cuales se indica la mediana, los cuartiles 25% y 75%; y los valores máximo y mínimo. Las diferencias estadísticamente significativas entre dos grupos se representaron con una línea continua y con un símbolo según el nivel de significancia: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

4.4. Citoquinas Inmunoreguladoras

En base a las propiedades inmunomoduladoras de TGF- β 2 e IL-10 resultó de interés analizar sus niveles mediante ELISAs de captura, utilizando placas de óptimo pegado y una combinación adecuada de anticuerpos comerciales, como fue descrito en materiales y métodos.

Los resultados se expresaron en función de una curva de calibración realizada por duplicado, utilizando a partir de 8 diluciones seriadas al medio concentraciones decrecientes de estándares séricos específicos, en el rango desde 2000 pg/mL hasta 15.6 pg/mL para TGF- β 2 (stock 70 ng/mL) y en el rango de 500 pg/mL hasta 3.9 pg/mL para IL-10 (stock 70 ng/mL).

Posteriormente se graficaron los valores de densidad óptica en función de la concentración y se buscó la curva que mejor se ajustara a los datos experimentales obtenidos.

A partir de la ecuación de la recta se calcularon las concentraciones correspondientes a cada muestra, teniendo en cuenta los valores que entraban en el rango de linealidad de la curva de calibración. Las muestras se valoraron por duplicado a partir de la fracción acuosa entera de cada muestra "AP" como "DP" para IL-10, mientras que para TGF- β 2 al requerir ser activada previamente, la muestra fue diluida, lo cual este factor fue considerado al momento de obtener la concentración final de la correspondiente citoquina.

En cuanto a las pérdidas encontradas producto de la pasteurización han sido parciales para el TGF- β 2 mientras que totales para la IL-10.

4.4.1. TGF- β 2

4.4.1.1. Evolución con el tiempo

La TGF- β 2 se detectó en todas las muestras del panel de calostros. Como se muestra en la Figura 6A y Tabla 1, la concentración de TGF- β 2 en calostros pasteurizados representada por dpp, presentó su mayor concentración durante el primer dpp (3929 pg/mL) para luego descender y alcanzar otro máximo hacia el quinto dpp. Mientras que la concentración representada a nivel de grupos (ver Figura 6B) muestra un comportamiento algo distinto en cuanto a la tendencia individual por dpp, presentando la menor concentración en el grupo correspondiente al calostro temprano (AP: 1400 pg/mL: DP: 956 pg/mL) y alcanzando su mayor concentración en el grupo de calostro intermedio (AP: 2168 pg/mL: DP: 1469 pg/mL) para luego decrecer como es de esperarse con el transcurso de los días hacia el grupo de calostro tardío (AP: 1973 pg/mL: DP: 1002 pg/mL). Estos resultados reflejan nuevamente la variabilidad individual que existe entre las diferentes muestras por día, aunque sin llegar a considerarse significativas respecto al transcurso de los dpp. A nivel global se obtuvo una concentración de 2077 pg/mL (AP) y 1313 pg/mL (DP) para el grupo de calostro durante la primera semana de lactancia, resultando del orden al reportado por Bottcher et al., (2000) y más recientemente por Tomicic et al., (2010) y Castellote et al., (2011).

4.4.1.2. Efectos de la Pasteurización

Nuestros resultados sobre la TGF- β 2 como muestran las Figuras 6B y 6C, evidenciaron que la pasteurización produjo pérdidas significativas a nivel global representado en todos los grupos, correspondiente con un valor de pérdida calculado de un 37%, que también puede interpretarse como un porcentaje de retención del 63% de TGF- β 2 en los calostros pasteurizados (ver Figura 7 y Tabla 3).

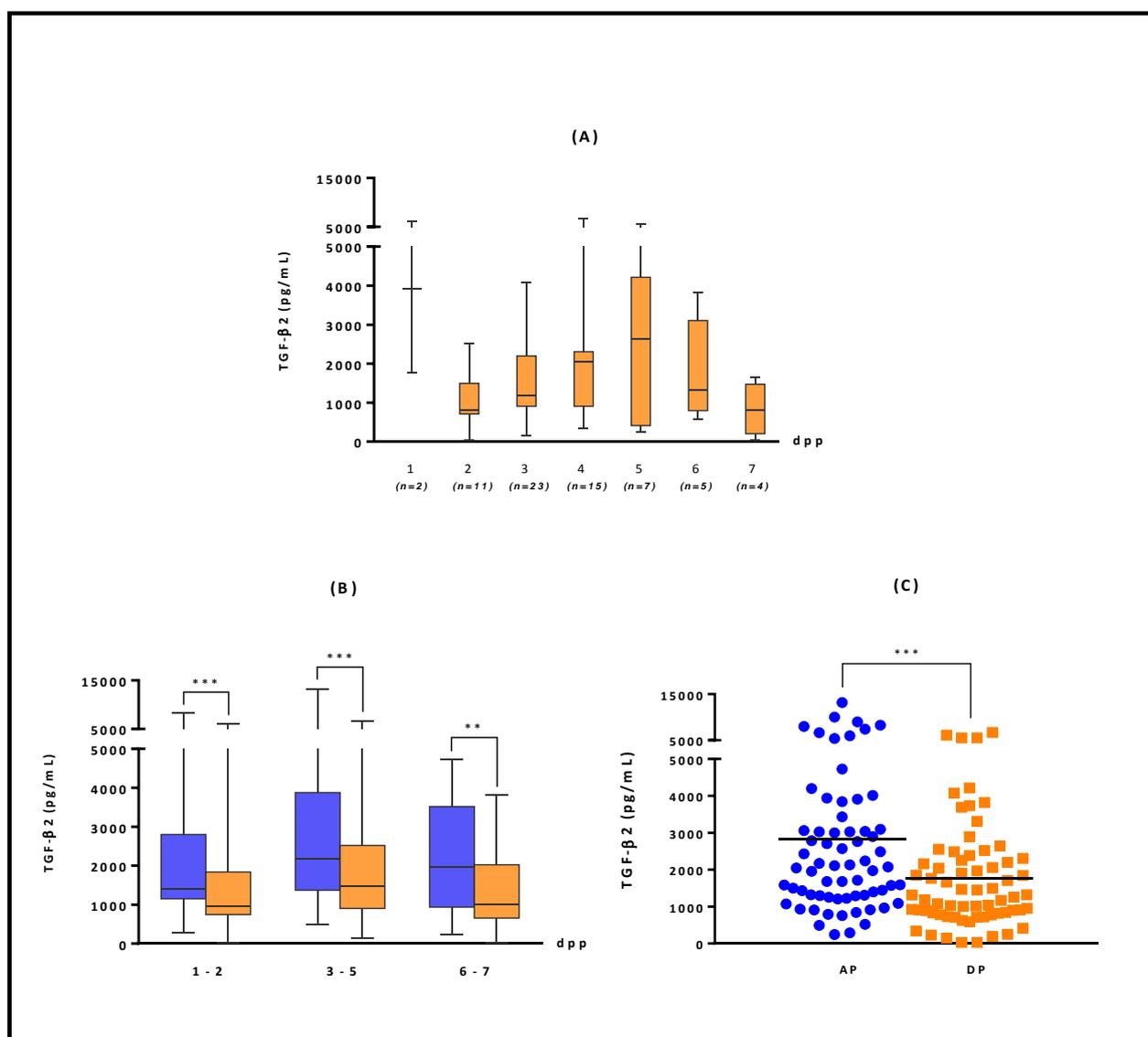


Figura 6. Citoquina inmunoreguladora TGF- β 2 y efectos de la pasteurización en calostros de la primer semana post parto. **(A)** dinámica de la concentración de TGF- β 2 en muestras pasteurizadas para cada dpp. **(B)** evolución de la concentración de TGF- β 2 por grupos definidos según los respectivos dpp y correspondiente determinación del efecto de pasteurización. **(C)** efecto global de la pasteurización sobre la TGF- β 2 del panel de calostros en estudio. Las muestras crudas (AP) se indican con ■, mientras que las pasteurizadas (DP) se corresponden con ■. En **(A)** y **(B)** los datos se representan en diagramas de caja, en los cuales se indica la mediana, los cuartiles 25% y 75%; y los valores máximo y mínimo. Las diferencias estadísticamente significativas entre dos grupos se representaron con una línea continua y con un símbolo según el nivel de significancia: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Tabla 1. Componentes bioactivos: concentración y evaluación del efecto de la pasteurización de Holder del panel de calostros según cada día post parto (dpp), especificando su correspondiente cantidad de muestras (n). La muestra AP representa al calostro crudo, mientras que la DP corresponde a la respectiva muestra pasteurizada. Los resultados se expresan en medianas.

<i>dpp</i>	<i>n</i>	IgA (g/L)		IgM (g/L)		TGF-β2 (pg/mL)	
		<i>AP</i>	<i>DP</i>	<i>AP</i>	<i>DP</i>	<i>AP</i>	<i>DP</i>
1	2	0.88	0.66	0.134	0.014	5425	3929
2	11	1.67	1.21	0.056	0.010	1322	817
3	23	1.30	1.09	0.046	0.008	1954	1188
4	15	0.96	0.68	0.032	0.006	2703	2041
5	7	1.52	1.13	0.051	0.011	3845	2645
6	5	0.62	0.45	0.045	0.007	2106	1318
7	4	1.23	0.88	0.025	0.007	1312	813

4.4.2. IL-10

4.4.2.1. Evolución con el tiempo

Respecto a la IL-10, el porcentaje de muestras con concentraciones detectables en el presente estudio como se muestra en la Tabla 2 fue del 10%, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (Bottcher et al., 2000; Tomicic et al., 2010). Mientras que la concentración de IL-10 fue de 21 pg/mL (9.4 - 58.2 pg/mL). Comparado con los hallazgos en la literatura, encontramos que dependiendo de la metodología empleada, niveles inferiores de IL-10 (0.36 pg/mL) fueron reportados por Espinosa-Martos et al., (2013) utilizando ELISA, mientras que valores verdaderamente altos (3304 pg/mL) fueron encontrados por Garofalo et al., (1995) mediante citometría de flujo, lo que sugiere que los aspectos técnicos pueden influir sobre los resultados al analizar muestras con una matriz tan compleja.

Es probable a su vez, como ha sido descrito (Filteau, 2009; Untalan et al., 2009), que ocurra un enmascaramiento por interacción con proteínas y/o lípidos y por este motivo no ser reconocida por los anticuerpos utilizados en el ensayo.

Para evaluar estos posibles efectos, se generaron muestras reconstituidas utilizando la fracción acuosa de calostros en los que previamente la concentración de la respectiva citoquina fue indetectable, agregando una concentración conocida de IL-10 recombinante humana con el objetivo de evaluar el efecto matriz. Así, se pudo corroborar que existe un efecto de enmascaramiento por parte de la matriz, por lo que se procedió a calcular el porcentaje de recuperación.

Los cálculos para estimar la recuperación de la IL-10 en las muestras reconstituidas mostraron que el porcentaje de recuperación (55-65%) de los calostros reconstituidos no es bueno cuando la concentración es baja (3-12 pg/mL), de manera que podría ser una posible explicación de por qué no lo llegáramos a detectar.

4.4.2.2. Efectos de la Pasteurización

Respecto al tratamiento térmico sobre los niveles de IL-10, del 10% de las muestras crudas que presentaron valores detectables (límite de detección: 7.8 pg/mL) antes de la pasteurización, sus correspondientes 7 muestras pasteurizadas presentaron niveles indetectables, evidenciando de esta forma la pérdida total de esta citoquina con la pasteurización (ver Figura 7 y Tabla 3).

Tabla 2. Citoquina Inmunoreguladora IL-10: representación de la distribución de los calostros crudos (AP) con concentraciones detectables. No se detectó IL-10 luego de la pasteurización.

IL-10: Muestras detectadas			
dpp	n	%	AP (pg/mL)^(*)
1 - 2	2/13	15	10.4; 35.0
3 - 5	4/45	9	9.4; 21.3; 34.9; 58.2
6 - 7	1/9	11	14.0
Total	7/67	10	21.0 (9.4 – 58.2)

(*) Valor de concentración correspondientes a muestras detectadas.
(límite de detección: 7.8 pg/mL)

4.5. Análisis global del efecto de la pasteurización de Holder

El efecto de la pasteurización de Holder, fue evaluado y calculado en base al porcentaje de retención, que se corresponde con el porcentaje de concentración que presenta la muestra pasteurizada “DP” respecto a la cruda “AP” luego del tratamiento térmico de pasteurización.

En suma, como se muestra en la Figura 7, podemos afirmar que a nivel global todos los componentes son afectados por la pasteurización, lo cual es el reflejo de lo obtenido anteriormente al comparar por grupos el efecto de la pasteurización y haber hallado diferencias significativas en todos los componentes. Mientras que el efecto de dicho tratamiento, evaluado por medio del cálculo del porcentaje de retención (ver Tabla 3) no es el mismo para todos, siendo la IgA el componente menos afectado, reteniendo el 78% de su concentración, seguido por el TGF- β 2 con el 63% y considerándose como drásticamente afectados la IgM (17%) e IL-10 (0%), recordando que este último solo fue detectado en el 10% del panel de calostros crudos analizado.

Tabla 3. Concentración global y Evaluación del efecto de la Pasteurización de Holder sobre los componentes con actividad inmunológica en el panel de calostros del BLH-CHPR. La muestra AP representa al calostro crudo, mientras que la DP corresponde a la respectiva muestra pasteurizada.

	AP		DP		Porcentaje de Retención
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
IgA (g/L)	1.30	0.22 - 5.18	0.97	0.21 - 4.07	78%
IgM (g/L)	0.045	0.010 - 0.35	0.008	0.002 - 0.06	17%
TGF- β 2 (pg/mL)	2077	246 - 13160	1313	31 - 6708	63%
IL-10 (pg/mL)	21.0	9.4 - 58.2	7.8	---	0%

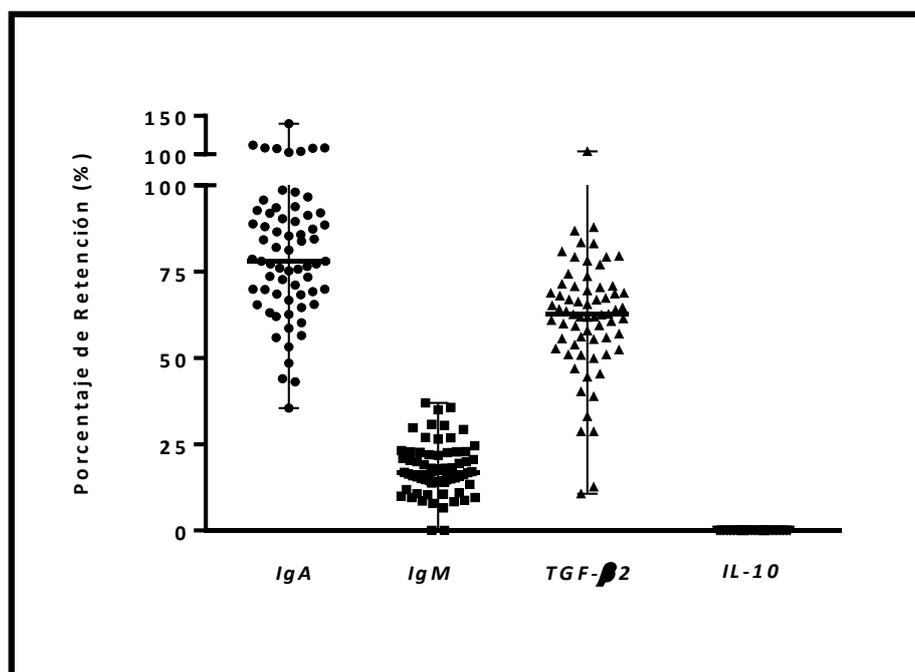


Figura 7. Evaluación del efecto de la Pasteurización de Holder sobre los componentes con actividad inmunológica en el panel de calostros. Donde se representa el porcentaje de retención (%) que presenta la muestra pasteurizada (DP) respecto a la cruda (AP) luego del tratamiento térmico de pasteurización.

5. Discusión

El aporte nutricional y de componentes activos inmunológicos de la leche de BLH depende principalmente de dos factores: la composición de la leche donada (Neville et al., 2001) y el efecto de su procesamiento (Ewaschuk et al., 2011). Su composición es relativamente constante, aunque algunos componentes varían de manera significativa durante la lactancia, el día e incluso durante una misma lactada.

Hasta la actualidad, en nuestro país no se registra ningún trabajo sobre la composición del calostro y son pocos los que han estudiado otros parámetros en la composición de la leche humana de nuestra población. Entre ellos se encuentran los trabajos realizados por Nelly Armand-Ugón (1946) sobre la bioquímica de la leche humana y más recientemente en el tiempo los de Mayans & Martell (1994; 1999) donde analizaron métodos para estimar el contenido energético y la calidad de la leche materna.

Respecto al análisis de leche procesada en BLH no existen antecedentes en nuestro medio, por lo que este trabajo propone aportar datos al estudiar por primera vez la composición inmunológica y calórica de los calostros de nuestra población y los efectos del proceso de pasteurización de Holder utilizado en el BLH-CHPR.

En el presente estudio, el contenido energético, de proteínas y principalmente de componentes bioactivos con propiedades inmunológicas del panel de calostros analizados mostraron cierta variabilidad en cuanto a su composición durante la primera semana de lactancia y a la pasteurización como tratamiento térmico de conservación.

5.1. Evolución del contenido energético y proteico con los días de lactancia

El panel de calostros presentó bajo nivel de calorías (668 kcal/L) acorde a lo esperado (Lawrence & Lawrence, 2007). Sin embargo en la descripción por grupos (ver Figura 3B), aunque no se considera significativo, se observa un ligero descenso con el correr de los días. Un resultado similar se obtuvo en un trabajo realizado en un BLH de Paraguay (López et al., 2011), en cuanto a que el contenido energético desciende en vez de aumentar con el transcurso de los días comparando leche de clase calostro (575 kcal/L) y madura (536 kcal/L), pero aquí las diferencias fueron aún más importantes al considerar que fueron dos clases de leches correspondientes a diferentes períodos de lactancia.

El hallazgo encontrado al comparar los diferentes grupos, podría atribuirse a una sobrevaloración de kcal/L en los primeros respecto a los últimos dpp, debido a la mayor presencia de beta caroteno en esta clase de muestras (Macias & Schuweigert, 2001); en base a la liposolubilidad y baja densidad de este componente. Considerando los resultados obtenidos y los posibles factores que se discuten, sería conveniente a futuro disponer de la metodología adecuada para cuantificar vitamina A, como forma de evaluar las posibles interferencias que pueda presentar dicho componente al estimar el contenido energético en los calostros mediante el método de crematocrito.

Respecto al contenido proteico, nuestro análisis de 67 calostros del BLH mostró que la máxima concentración se alcanzó durante los primeros dpp (13.3 g/L), con valores similares a los reportados por Shi et al., (2011). Mientras que al comparar por grupos se observa con el correr de los días que desciende significativamente a partir del sexto dpp. Esta disminución en respuesta a las necesidades fisiológicas del recién nacido que se reflejan en la dinámica de la composición podría ser considerada relativa y no absoluta, dado que la misma puede obedecer en realidad a un efecto de dilución de la concentración según plantea Pérez et al., (1980) por el aumento en la cantidad de calostro secretado debido al incremento del contenido de agua hacia el cuarto dpp y que continua en forma progresiva, lo cual conduce a un mayor volumen de leche. A su vez los resultados obtenidos demuestran que la variabilidad individual es muy grande, por lo que se justificaría considerar una valoración individual.

En cuanto se sabe que las tres fracciones que componen la leche presentan una relación de proporcionalidad entre sí, derivado del propio movimiento de síntesis de la leche humana, la variación en la concentración de uno de los constituyentes siempre acarrea alteraciones en los demás, pudiendo esta relación de proporcionalidad darse en forma directa o indirecta, dependiendo de los constituyentes considerados. Los constituyentes liposolubles, que integran la fase dispersa de fracción emulsión, por ejemplo, tienden a relacionarse de forma inversamente proporcional con las proteínas del suero de la leche o proteínas solubles, principales representantes de los inmunobiológicos. Tal tendencia permite elaborar la siguiente hipótesis: “cuanto mayor el contenido de grasa mayor será el aporte energético y menor será la concentración de inmunobiológicos (Almeida, 2008a)”.

Un estudio realizado por Keller & Neville, (1986) evaluó distintos métodos espectrofotométricos para determinar proteínas totales en leche humana, incluido el método de Bradford (Coomassie-Blue).

Los resultados de los diferentes métodos fueron comparados con los de un método de determinación de nitrógeno total (micro-Kjeldahl); donde todos se correlacionaron significativamente. El método de Bradford en particular obtuvo un coeficiente de correlación de 0.89.

Este trabajo permitió a su vez determinar la sensibilidad de los métodos para diferentes proteínas que se encuentran en la matriz láctea. Los resultados al respecto señalan que la proteína que presentó mayor coeficiente de absorción no fue la misma para todos los métodos.

Actualmente existen varios métodos usados para determinar proteínas totales en leche humana, pero en general estos métodos no se encuentran estandarizados contra el método de referencia y los valores reportados en la literatura a veces varían mucho; además no han aparecido comparaciones sistemáticas de varios métodos para el análisis de las proteínas de la leche.

Respecto a la utilización de los métodos para la determinación de proteínas totales en calostros, podemos decir que la elección y el estudio por el método de Bradford como por el método de Absorción UV a 280/260 nm, fueron los apropiados ya que lograron un buen desempeño en la práctica por el método de Kjeldahl. Debemos aclarar que se pudo evidenciar que el método de Bradford muestra un comportamiento diferencial, dado que logra un buen desempeño siempre y cuando se utilice como estándar la fracción acuosa de un pool de matriz de leche humana, valorado previamente por el método de referencia, debido a que el método utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar de referencia subestima la concentración proteica de los calostros al ser un método que depende altamente de la composición aminoacídica.

La buena correlación obtenida entre los métodos de Bradford y Absorción UV a 280/260 nm (ver Figura 4C), permiten proponer a este último como un posible método a incorporar para determinar proteínas totales de manera confiable, rápido y práctico en la rutina de trabajo de los BLH.

5.2. Componentes inmunológicos en calostros crudos

Se desarrollaron métodos de ELISA de captura para determinar niveles de IgA e IgM, corroborando los valores de algunas muestras tomadas como control interno por la técnica clásica de Inmunodifusión radial (IDR).

5.2.1. Inmunoglobulinas

Los niveles de IgA obtenidos en el panel de calostros analizados (1.30 g/L) fueron similares a los reportados recientemente por otros autores como Tomicic et al., (2010); Shi et al., (2011) y Souza et al., (2014). Sin embargo, niveles ligeramente más altos han sido encontrados por Ronayne de Ferrer et al., (1984) (2.10 g/L) y verdaderamente altos por Ramirez-Santana et al., (2012) (8.00 g/L) y Espinosa-Martos et al., (2013) (7.18 g/L en calostro; 5.96 g/L en madura).

La IgA resultó ser la Inmunoglobulina de mayor concentración analizada, demostrando los resultados encontrados por varios autores. La máxima concentración encontrada hacia el segundo dpp, sumado a que representó el 10% del total de proteínas, reafirma la importancia que este compuesto representa en los primeros días al proveer de inmunidad pasiva al recién nacido. Considerándose la principal Inmunoglobulina que aporta protección compensando la inmadurez de su sistema inmune frente a diversos agentes ambientales a los que se encuentra expuesto.

La concentración de IgM obtenida en el presente trabajo (0.045 g/L) fue intermedia respecto a las reportadas por otros autores, según: Koenig et al., (2005) (0.014 g/L); Shi et al., (2011) y Souza et al., (2014) (0.120 g/L; 0.280 g/L, respectivamente). A su vez su mayor concentración fue temprana (1 dpp) reafirmando lo obtenido respecto a la IgA en cuanto a la importancia del suministro de calostro temprano en las primeras horas de vida del recién nacido.

5.2.2. Citoquinas

Las citoquinas son polipéptidos muy lábiles, con actividad reguladora sobre la función de diversas poblaciones celulares. En particular, el TGF- β 2 es la citoquina inmunosupresora más abundante en la leche humana y se mantiene relativamente estable en su tránsito por el tracto intestinal del neonato (Prokesova et al., 2006).

La TGF- β 2 fue detectada en todas las muestras del panel de calostros analizados, obteniendo una concentración global (2077 pg/mL) muy similar a lo reportado según Bottcher et al., (2000) y más recientemente por otros autores como Tomicic et al., (2010) y Castellote et al., (2011). A su vez la máxima concentración correspondió al primer dpp, demostrando nuevamente la riqueza del calostro temprano en el contenido de componentes inmunológicos.

Sin embargo, respecto a los resultados se han encontrado diferencias en los niveles informados desde ligeramente más bajos (471 pg/mL) encontrados por Prokesova et al., (2006) hasta verdaderamente altos (16000 pg/mL) por Espinosa-Martos et al., (2013) aunque dicho autor no especifica a que dpp pertenecen las muestras en estudio, a nivel general estas diferencias pueden estar afectadas principalmente por la metodología utilizada.

Respecto a la IL-10, si bien se corroboró que el ensayo funcionó correctamente, se consideraron las posibles complicaciones técnicas de determinar componentes trazas en un sistema tan complejo como la leche. Existiendo la posibilidad de un enmascaramiento por interacción de la IL-10 con proteínas y/o lípidos y por este motivo no ser reconocida por los AcMo lo cual ha sido descrito por Filteau (2009) y Untalan et al., (2009). Por ejemplo interactuando con glóbulos de leche y ser eliminadas en fase lipídica.

Para evaluar estos posibles efectos, se generaron muestras reconstituidas utilizando la fracción acuosa de calostros en el que previamente la concentración de la respectiva citoquina fue indetectable y al que le agregamos una concentración conocida de IL-10 recombinante humana con el objetivo de evaluar el efecto matriz. Se pudo corroborar que existe un efecto significativo de la matriz, por lo que se procedió a calcular el porcentaje de recuperación.

Los cálculos para estimar la recuperación de la IL-10 en las muestras reconstituidas mostraron que el porcentaje de recuperación de los calostros reconstituidos no era bueno cuando la concentración es baja, de manera que podría ser una posible explicación de por qué no lo llegáramos a detectar IL-10. A su vez, comparando con los resultados reportados por Castellote et al., (2011), quienes detectaron IL-10 en el 73% de los calostros (hasta los 4 dpp), los valores están en nuestro límite inferior así que también es posible atribuir el resultado a una sensibilidad insuficiente.

Con el fin de aumentar la sensibilidad del ELISA, aplicamos variaciones a las condiciones del protocolo original del fabricante (ver 3.2.7.2.) y probamos otras posibles condiciones de pretratamientos sobre la muestra. Se realizó un tratamiento previo con una sal biliar donde según propone Filteau (2009) la cual liberaría la IL-10 retenida en los glóbulos de grasa. Por otra parte, se concentró la IL-10 de la muestra por medio del método de centrifugación al vacío, donde se buscó concentrar 5 veces la muestra de forma de alcanzar niveles detectables.

Las condiciones incorporados sobre el diseño del ELISA mejoraron los resultados aumentando la sensibilidad de la técnica, mientras que los pretratamientos de la muestra no mostraron el efecto deseado y no se evidenciaron cambios importantes en su detección, por el contrario las muestras puras se detectaron de mejor manera que las correspondientes tratadas.

En cuanto al porcentaje de muestras con concentraciones de IL-10 detectables en el presente estudio (10%), los mismos fueron similares a los reportados por otros autores como Bottcher et al., (2000) y más recientemente a los de la población sueca analizados por Tomicic et al., (2010), donde la mayoría correspondieron a muestras obtenidas en los 2 primeros días de lactancia reafirmando la importancia del aporte temprano de leche.

Otros autores tampoco han logrado detectar IL-10 en el 100% de las muestras analizadas, tal es el caso como ya mencionamos del trabajo realizado por Castellote et al., (2011) donde detecta en 16 de los 22 calostros a termino analizados durante los primeros 4 dpp.

Según propone Tomicic et al., (2010) la concentración de TGF- β e IL-10 estaría posiblemente relacionado con la carga microbiana ambiental a la que se encuentra expuesta la madre, de manera que un menor contacto con ciertos microorganismos o sus derivados explicaría una baja concentración de IL-10 mientras que se asociaría con una alta concentración de TGF- β . A su vez, la reciente explicación concuerda con los hallazgos encontrados por Espinosa-Martos et al., (2013) respecto a que obtiene una alta concentración de TGF- β 2 con una baja concentración de IL-10.

En suma, respecto a la variación con el tiempo, se observa que la máxima concentración de componentes inmunológicos se obtiene en los primeros días definido como calostro temprano para luego descender, siguiendo la tendencia con el transcurso de la lactancia, hasta alcanzar niveles constantes presentes finalmente en la leche madura como es descrito según Castellote et al., (2011). Este hallazgo está de acuerdo con lo esperado, respecto al rol que desempeñan estos componentes aportados por la leche en la salud del recién nacido, compensando el déficit innato de su sistema inmune inmaduro. Al tiempo que su concentración se encuentra afectada producto del efecto de dilución, debido al aumento del volumen dado por la bajada de la leche hacia el 4 dpp de la misma manera que se discutió para la concentración de proteína totales.

5.3. Efecto de la Pasteurización de Holder

Aunque el tratamiento térmico moderado utilizado de rutina en nuestro BLH antes de la distribución de la leche (62.5°C; 30 min), muestra un buen compromiso entre la seguridad microbiológica (destruyendo los microorganismos patógenos) y la calidad nutricional (Hartmann et al., 2007), también es conocido el efecto deletéreo que tiene sobre algunos componentes de la leche con actividad biológica, incluyendo la flora normal (Arslanoglu et al., 2010; Moro & Arslanoglu, 2012) y este efecto tendría mayor significancia en los calostros (Espinosa-Martos et al., 2013).

Las proteínas en general sufren desnaturalización y/o agregación con el tratamiento térmico de Holder, el cual afecta su estructura causando el bloqueo de ciertos aminoácidos como Lisina, Histidina y Cisteína, condicionando su actividad biológica. Y en particular, los anticuerpos son glicoproteínas que pueden sufrir cambios en la estructura terciaria afectando en mayor o menor grado la conformación del paratope o su zona de interacción con receptores celulares reduciendo su actividad inmunológica. El grado de inactivación depende principalmente del isotipo (IgA, IgM) y de su especificidad.

Varios autores han analizado los efectos del tratamiento de Holder sobre los macronutrientes y micronutrientes con efectos biológicos; los resultados que fueron sintetizados en una revisión reciente (Ewaschuk et al., 2011) muestran que varios de los componentes implicados en las defensas son afectados en gran medida, en algunos casos alcanzando la destrucción total como con la actividad lipasa y la IgM. Los componentes mayoritarios IgA y lactoferrina, esenciales en las defensas frente a infecciones bacteriales y virales, son afectados por el tratamiento térmico. La disminución de la concentración de IgA y de la capacidad de unión de hierro de la lactoferrina oscilaron entre 48% y 80% respectivamente para los trabajos incluidos en el reporte (Lawrence, 1999; Koenig et al., 2005; Czank et al., 2009).

En relación a los factores de crecimiento y citoquinas inmunoreguladoras el comportamiento es más heterogéneo; mientras que el TGF- β parece no verse afectado mayormente (Mcpherson & Wagner, 2001; Untalan et al., 2009).

En este contexto es una prioridad para los BLH evaluar el efecto de la pasteurización de Holder como tratamiento de conservación sobre los componentes con actividad biológica presentes en la leche humana, y en particular sobre los calostros de nuestro banco.

5.3.1. Efectos de la pasteurización de Holder sobre la concentración de Proteínas Totales de calostros

Nuestros resultados muestran que no ocurren pérdidas significativas del contenido proteico durante la pasteurización en los distintos grupos seleccionados ni a nivel global para el panel de calostros analizados, al igual que lo reportado según Koenig et al., (2005) y Braga & Palhares., (2007). Por el contrario, ocurre un incremento significativo de la concentración proteica a nivel global y es a expensas del grupo de calostro intermedio (ver Figura 4A). Este aumento podría atribuirse a pérdidas de agua por evaporación producto del calentamiento durante el proceso de pasteurización. Por otra parte, el pasaje de proteínas de la fracción emulsión a la fracción acuosa donde se realiza la determinación, se reportó previamente (Cavaletto et al., 2008) y no es posible descartar que contribuye en cierta medida.

5.3.2. Efectos de la pasteurización de Holder sobre la concentración de Inmunoglobulinas de calostros

Tanto la IgA total como la secretora han sido de los componentes más estudiados principalmente en leche madura y varios son los autores que han reportado pérdidas variables luego de la pasteurización.

Nuestros hallazgos permiten evidenciar la pérdida estimada de un 22% de IgA, similar a lo encontrado recientemente por otros autores (Permanyer et al., 2010; Souza et al., 2014). Si bien se reconoce una pérdida del contenido, la misma se encuentra entre las más bajas al compararse con otros estudios donde han reportados pérdidas de más de la mitad de su concentración (62-64%) según Koenig et al., (2005). Estas diferencias encontradas por los diferentes grupos de investigadores podrían ser explicadas por la metodología de trabajo empleada al observarse una gran variedad de técnicas aplicadas para la detección de IgA, ejemplo técnica clásica de Inmunodifusión radial (IDR) y el ELISA.

Por otra parte, el trabajo realizado por Czank et al., (2009) encontró una pérdida del 28% y propone que sería la temperatura de pasteurización y no el tiempo de mantenimiento del proceso el factor crítico en el porcentaje de retención de IgA.

Respecto a la IgM, aunque su comportamiento frente al efecto de la pasteurización no ha sido tan bien estudiado como el de la IgA, se ha evidenciado que es de las inmunoglobulinas más inestables al tratamiento térmico (Ewaschuk et al., 2011).

Los resultados del efecto de la pasteurización sobre la IgM del panel de calostros analizados, muestran una pérdida significativa considerada consistentemente alta (79-85%) en todas las muestras individuales.

Mientras que pérdidas moderadas y significativas ($p < 0.05$) han sido informadas y consideradas entorno al 51% según Souza et al., (2014) (AP=0.28 g/L, obtenida con calostro extraído en los primeros 4 dpp).

También se han reportado pérdidas totales según Ford et al., (1977) (AP= 0.10 g/L, trabajando con leche madura) y más recientemente por Koenig et al., (2005) (AP=0.014 g/L, concentración muy baja) lo cual se considera lógico, ya que en ambos casos las concentraciones son bajas antes del proceso si se lo compara con Souza et al., (2014). Aunque este comportamiento no se cumple al comparar nuestros valores con los de Ford et al., (1977) dado que nuestra concentración (AP= 0.045 g/L) es menor y luego del proceso si bien la pérdida es alta no es total, tampoco se espera en teoría que la concentración AP de Ford sea mayor a la nuestro calostro ya que él trabajó con leche madura.

Una posible explicación a la pérdida globalmente alta de la IgM fue propuesta por Espinosa-Martos et al., (2013) donde considera que los componentes con un alto peso molecular serían mayormente afectados por la pasteurización, considerando probablemente una mayor exposición al medio.

En base a estos resultados, la IgM podría considerarse un parámetro biológico relevante a utilizar como indicador del efecto deletéreo de los procesamientos de la leche en la búsqueda de métodos alternativos de pasteurización.

A modo de consideración general y en base a los resultados reportados se ha planteado a nivel mundial la necesidad de buscar procedimientos alternativos al clásico que logren minimizar las pérdidas de componentes bioactivos durante el procesamiento de la leche humana.

Por ejemplo, el tratamiento térmico de alta temperatura durante corto tiempo (HTST) realizado a 72°C durante 15 segundos (Jensen, 1995) se estudió mediante cromatografía homogénea y en gradiente SDS-PAGE y las bandas de su patrón proteico se mostró idéntico a la leche fresca sin tratar. Mientras que en el método de Holder se observó que redujo la intensidad de ciertas bandas, que posteriormente fueron identificadas a través de espectrometría de masas en tándem, donde se detectaron los componentes modificados para cada banda. Donde una de las modificaciones encontradas correspondió a la IgA, mientras que otro estudio donde también se evaluó el método HTST no encontró alteración respecto a la IgA (Lawrence, 1999). En suma, si este tratamiento se aplica a la leche humana, se producen mínimas pérdidas de factores inmunológicos. Sin embargo, es un método que no puede utilizarse en los BLH debido a la ausencia de equipos que puedan pasteurizar volúmenes de muestra pequeños, lo cual es una limitación para la pasteurización de la leche humana (Jensen, 1995) sobre todo en los BLH como el nuestro que adoptan el criterio general de no poolear leches de diferentes madres.

Otro método probado a 56°C mostró que la IgA se mantuvo estable (Ogundele, 2000) aunque este método no asegura la destrucción total de microorganismos como se consigue a 62.5°C.

Mientras que otras tecnologías más recientes muestran que es posible preservar el contenido de la fracción de IgA mediante procesamiento de la leche con alta presión (400 MPa, 5 minutos, a 12°C) (Permanyer et al., 2010). En cuanto a la retención de su capacidad de unión al antígeno, se ha analizado la reactividad frente a *E. coli* enteropatógena (Viazis et al., 2008) los resultados muestran una mejor actividad con el tratamiento a alta presión, que permite conservar entre el 75% y 85.6% la reactividad por ELISA dependiendo de las condiciones experimentales aplicadas, en contraste con el 51.2% de disminución en la reactividad cuando se aplicó el tratamiento clásico de pasteurización.

En suma, hay perspectivas de poder utilizar en el futuro otros métodos de conservación de la leche humana que mejoren aún más su calidad inmunológica, pero se está aún lejos de la implementación en la rutina del BLH.

5.3.3. Efectos de la pasteurización de Holder sobre la concentración de Citoquinas de calostro

En cuanto a las citoquinas, las pérdidas encontradas producto de la pasteurización resultaron parciales para el TGF- β 2 (37%) mientras que fueron totales para la IL-10.

Respecto a la IL-10, del 10% de las muestras detectadas antes del tratamiento térmico sus niveles se hacen indetectables luego de la pasteurización.

El trabajo de Espinosa-Martos et al., (2013) es el único trabajo hasta el momento, donde encontramos que no reportan pérdidas de las citoquinas en estudio en contraste con nuestros resultados sino que por el contrario las concentraciones después de pasteurizar son mayores, aunque las diferencias no llegan a ser significativas tanto en muestras de calostro como en leche madura.

En Suma:

El calostro temprano obtenido durante los primeros dpp demostró ser el más rico en componentes inmunológicos y proteicos comparado con el calostro tardío. Estos resultados son consistentes con el rol biológico que desempeñan estos componentes ya que proveen función contra infecciones, anti-inflamatoria y protección inmunomoduladora, compensando el déficit innato de su sistema inmune inmaduro (Garofalo, 2010; Ballard & Morrow, 2013).

A nivel general se confirma una alta variabilidad interindividual en la concentración de los componentes del panel de calostro estudiados de nuestro BLH en el período de estudio, dependiendo principalmente de las donantes al igual que lo encontrado por otros autores (Espinosa-Martos et al., 2013) por lo que se justificaría considerar una valoración individual de los lotes.

Si bien solo los trabajos de Koenig et al., (2005) y Souza et al., (2014) fueron realizados concretamente en muestras de calostros, suponemos que la principal razón para comparar y poder explicar la gran dispersión en los resultados obtenidos por los distintos grupos debería corresponder a los diversos métodos de obtención de la muestra utilizados e incluso al rango de semanas de gestación.

Respecto a los efectos del tratamiento térmico, podemos afirmar que a nivel global todos los componentes bioactivos estudiados son afectados por la pasteurización de Holder, lo cual es el reflejo de lo obtenido anteriormente al comparar por grupos y haber hallado diferencias significativas en todos los componentes.

Es importante considerar que gran parte de los trabajos consultados a nivel mundial no fueron realizados con muestras provenientes de BLH, quedando los diferentes resultados obtenidos sujetos a las diferentes condiciones y equipamientos empleados durante el proceso de pasteurización, así como de los métodos de detección empleados los cuales podrían contribuir afectando los valores esperados (Kverka et al., 2007).

Mientras que en el caso de corresponder a muestras de un BLH, también existe la posibilidad de encontrar diferencias en cuanto a protocolos y condiciones de procesamiento según la red de BLH al que se pertenezca. Por lo cual se evidencia y queda de manifiesto la necesidad de disponer de métodos de valoración para cada centro, debido a que las diferentes condiciones de procesamiento utilizadas desde la extracción hasta la pasteurización también podrían contribuir a la variabilidad y afectar la calidad inmunológica de la leche.

6. Conclusiones

Este trabajo reporta la primera caracterización sobre contenido proteico, de citoquinas e inmunoglobulinas totales en un panel de muestras representativo dentro de nuestra población, que incluye el 67% de los calostros procesados y aptos para el consumo durante el período setiembre 2012 - setiembre 2013 en el BLH-CHPR.

Se desarrollaron métodos de ELISA para la determinación de los isotipos de inmunoglobulinas secretorias en leche IgA e IgM. Ambos métodos podrían implementarse con equipamiento relativamente simple y de bajo costo permitiendo la selección de calostros con alto contenido de inmunoglobulinas.

Respecto al contenido de proteínas totales se logró implementar el método de Absorción UV ($A_{280/260 \text{ nm}}$) para su determinación. Dentro de las múltiples ventajas que otorga el método, se considera sumamente económico, dado que no requiere el uso de reactivos comerciales auxiliares y más importante aún, cabe señalar el escaso volumen utilizado ($2\mu\text{L}$) para su determinación, evitando así el desperdicio de muestras especialmente al analizar muestras de calostros, donde el volumen de muestras es significativamente menor, limitado a la producción y su donación.

En cuanto al alcance del método de Absorción UV ($A_{280/260 \text{ nm}}$) frente a una posible incorporación en la rutina de trabajo y aplicación en otros bancos, podríamos destacar su reproducibilidad y rapidez en la obtención del resultado, además de su sencillez respecto a la metodología.

A nivel general los resultados reflejan el carácter dinámico de la composición de la leche en los primeros días de lactancia producto de la variación interindividual y dependencia del momento de obtención de la muestra.

Las pérdidas por el tratamiento térmico fueron variables para las inmunoglobulinas y TGF- β 2, mientras que resultaron totales para la IL-10.

Basados en estos datos, se justificaría la determinación individual de cada muestra procesada en el BLH respecto a los diferentes compuestos estudiados, con el fin de poder ampliar la información que posibilite enriquecer su clasificación y por lo tanto optimizar los recursos en mejoras de potenciar la calidad de las muestras solicitadas en relación a los criterios médicos, que repercutirá en la calidad de vida del recién nacido.

A nivel mundial existen pocos trabajos que describan la variación temporal del contenido de proteínas y componentes inmunológicos de los calostros, por lo que este trabajo aporta a profundizar en el conocimiento de la composición de la leche humana.

La información obtenida en el presente trabajo apoya la tendencia mundial sobre la necesidad de investigar métodos alternativos de pasteurización que permitan mayor retención de los componentes bioactivos preservando la seguridad microbiológica, para lograr lotes de calostro de mayor calidad inmunológica para situaciones de máxima vulnerabilidad.

7. Bibliografía

- Adkins, B. (1999). "T-cell function in newborn mice and humans." *Immunol Today* 20(7): 330-335.
- Aitken, A. & M. P. Learmonth (2002). Protein Determination by UV Absorption. En: Walker, J. M. The Protein Protocols Handbook. Totowa, New Jersey, Humana Press, p.3-6.
- Akobeng, A. K., A. V. Ramanan, et al. (2006). "Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies." *Arch Dis Child* 91(1): 39-43.
- Almeida, J. A. G., V. Guimarães & F. R. Novak. (2005). Normas técnicas redblh-br para bancos de leche humana: Pasteurización de la Leche humana Ordeñada - BLH-IFF/NT - 34.05. [Internet], Rio de Janeiro, FIOCRUZ/IFF-BLH. Disponible desde < <http://fiocruz.br/redeblh/media/pasteurizaesp.pdf>> [Acceso 15 de Noviembre 2014].
- Almeida, J. A. G. (2008a). Seleção e Classificação. En: Barcellos, P. Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos (Série Tecnologia em Serviços de Saúde). Brasília, Anvisa, p.115-130.
- Almeida, J. A. G. (2008b). Pasteurização. En: Barcellos, P. Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos (Série Tecnologia em Serviços de Saúde). Brasília, Anvisa, p.134-138.
- Arslanoglu, S., E. Bertino, et al. (2010). "Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank." *J Matern Fetal Neonatal Med* 23(2): 1-20.
- Ballard, O. & A. L. Morrow (2013). "Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors." *Am J Pediatr Clin North* 60(1): 49-74.
- Bottcher, M. F., M. C. Jenmalm, et al. (2000). "Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers." *Pediatr Res* 47(1): 157-162.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Braga, L. P. M. & D. B. Palhares (2007). "Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk." *J Pediatr* 83(1): 59-63.
- Brandtzaeg, P., D.E. Nilssen, et al. (1991). "Ontogeny of the mucosal immune system and IgA deficiency." *Am Gastroenterol Clin North* 20(3): 397-439.
- Brandtzaeg, P. (2003). "Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant." *Vaccine* 21(24): 3382-3388.
- Brandtzaeg, P. (2010). "The mucosal immune system and its integration with the mammary glands." *J Pediatr* 156(2 Suppl): S8-15.
- Castellote, C., R. Casillas, et al. (2011). "Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk." *J Nutr* 141(6): 1181-1187.
- Cavaletto, M., M. G. Giuffrida, et al. (2008). "Milk fat globule membrane components--a proteomic approach." *Adv Exp Med Biol* 606: 129-141.

- Cruz, J. R., L. Gil, et al. (1988). "Breast milk anti-Escherichia coli heat-labile toxin IgA antibodies protect against toxin-induced infantile diarrhea." *Acta Paediatr Scand* 77(5): 658-662.
- Czank, C., D. K. Prime, et al. (2009). "Retention of the immunological proteins of pasteurized human milk in relation to pasteurizer design and practice." *Pediatr Res* 66(4): 374-379.
- Dewey, J. K., M. J. Heinig, et al. (1995). "Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants." *J Pediatr* 126(5 Pt 1): 696-702.
- Dvorak, B. (2010). "Milk epidermal growth factor and gut protection." *J Pediatr* 156(2 Suppl): S31-35.
- Espinosa-Martos, I., A. Montilla, et al. (2013). "Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after holder pasteurization." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 56(5): 560-568.
- Evans, T. J., H. C. Ryley, et al. (1978). "Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk." *Arch Dis Child* 53(3): 239-241.
- Ewaschuk, J. B., S. Unger, et al. (2011). "Effect of pasteurization on immune components of milk: implications for feeding preterm infants." *Appl Physiol Nutr Metab* 36(2): 175-182.
- Field, C. J. (2005). "The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants." *J Nutr* 135(1): 1-4.
- Filteau, S. (2009). Measuring trace immune factors in human milk: Workshop summary. En: Goldberg G, et al. Breast-Feeding: Early influences on later health. Adv Exp Med Biol, Springer, 639: p.331-337.
- Ford, J. E., B. A. Law, et al. (1977). "Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents." *J Pediatr* 90(1): 29-35.
- Garofalo, R., S. Chheda, et al. (1995). "Interleukin-10 in human milk." *Pediatr Res* 37(4 Pt 1): 444-449.
- Garofalo, R. (2010). "Cytokines in human milk." *J Pediatr* 156(2 Suppl): S36-40.
- Gerstein, H. C. (1994). "Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus. A critical overview of the clinical literature." *Diabetes Care* 17(1): 13-19.
- Goldman, A. S. (1993). "The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties." *J Pediatr Infect Dis* 12(8): 664-671.
- Goldman, A. S. (2000). "Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective." *J Nutr* 130(2 Suppl): S426-431.
- Greer, F. R., S. H. Sicherer, et al. (2008). "Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas." *Pediatrics* 121(1): 183-191.
- Gregory, K. E. & W. A. Walker (2013). "Immunologic factors in human milk and disease prevention in the preterm infant." *Curr Pediatr Repr* 1(4): 222-228.

- Hartmann, B. T., W. W. Pang, et al. (2007). "Best practice guidelines for the operation of a donated human milk bank in an Australian NICU." Early Hum Dev 83(10): 667-673.
- Holmberg, H., J. Wahlberg, et al. (2007). "Short duration of breast-feeding as a risk-factor for beta-cell autoantibodies in 5-year-old children from the general population." Br J Nutr 97(1): 111-116.
- Jensen, R. G. (1995). Introduction. En: Jensen, R. G. In Handbook of milk composition. California, Academic Press, p.1-3.
- Jimenez, R. (2001). Lactancia materna. En: Tojo, R. Tratado de nutrición pediátrica. Barcelona, Dyoma SL, p.377-386.
- Kalliomaki, M., A. Ouwehand, et al. (1999). "Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age". J Allergy Clin Immunol 104(6): 1251-1257.
- Keller, R. P. & M. C. Neville (1986). "Determination of total protein in human milk: comparison of methods". Clin Chem 32(1 Pt 1): 120-123.
- Koenig, A., E. M. de Albuquerque Diniz, et al. (2005). "Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization". J Hum Lact 21(4): 439-443.
- Kverka, M., J. Burianova, et al. (2007). "Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array". Clin Chem 53(5): 955-962.
- Lawrence, R. A. (1999). "Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk". Acta Paediatr Suppl 88(430): 14-18.
- Lawrence, R. A., & R. M. Lawrence. (2007). Bioquímica de la leche humana. En: Lawrence, R. A. & R. M. Lawrence. Lactancia Materna. Una guía para la profesión médica. Madrid, Elsevier, p.111-176.
- Lawrence, R. M. & C. A. Pane (2007). "Human Breast Milk: Current Concepts of Immunology and Infectious Diseases". Curr Probl Paediatr Adolesc Health Care 37(1): 7-36.
- Letterio, J. J., A. G. Geiser, et al. (1994). "Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice". Science 264(5167): 1936-1938.
- Lönnerdal, B. (2003). "Nutritional and physiologic significance of human milk proteins". Am J Clin Nutr 77(6): 1537-1543.
- López, M., M. Blanes, M. Herrera & C. Mora. (2011). Estudio de la calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche humana colectada por el BLH del hospital materno infantil San Pablo. [on line], Disponible desde <<http://www.ifcc.org/media/215911/Banco%20del%20leche%umana.pdf>> [Acceso 11 de Octubre 2014].
- López-Álvarez, M. J. (2007). "Proteins in human milk". Breastfeed Rev 15(1): 5-16.
- Lucas, A., J. A. Gibbs, et al. (1978). "Creatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk". Br Med J 1(6119): 1018-1020.
- Machtiger, S. & R. Moss (1986). "Cow's milk allergy in breast-fed infants: the role of allergen and maternal secretory IgA antibody". J Allergy Clin Immunol 77(2): 341-347.

- Macias, C. & F. J. Schuweigert (2001). "Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation". Ann Nutr Metab 45(2): 82-85.
- Mayans, E. & M. Martell (1999). "Control de calidad de la leche materna#". Artículo especial - Sección Latinoamericana - Región Cono Sur. Arch Argent Pediatr 97(2): 109-115.
- McGuire, W. & M. Y. Anthony (2003). "Donor human milk versus formula for preventing necrotising enterocolitis in preterm infants: systematic review". Arch Dis Child Fetal Neonatal 88(1): F11-14.
- McPherson, R. J. & C. L. Wagner (2001). "The effect of pasteurization on transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta 2 concentrations in human milk". Adv Exp Med Biol 501: 559-566.
- Menon, G. & T. C. Williams (2013). "Human milk for preterm infants: why, what, when and how?". Arch Dis Child Fetal Neonatal 98(6): 559-563.
- Montagne, P., M. L. Cuilliere, et al. (1999). "Immunological and nutritional composition of human milk in relation to prematurity and mother's parity during the first 2 weeks of lactation". J Pediatr Gastroenterol Nutr 29(1): 75-80.
- Moro, G. & S. Arslanoglu (2012). "Heat treatment of human milk". J Pediatr Gastroenterol Nutr 54(2): 165-166.
- Mosconi, E., A. Rekima, et al. (2010). "Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development". Mucosal Immunol 3(5): 461-474.
- Neville, M.C., J. Morton, et al. (2001). "Lactogenesis: The transition from pregnancy to lactation". Am Pediatr Clin North 48(1): 35-52.
- Ogundele, M. O. (2000). "Techniques for the storage of human breast milk: implications for anti-microbial functions and safety of stored milk". J Pediatr 159(11): 793-797.
- Organización Mundial de la Salud. (2003). Estrategia Mundial para la Alimentación del Lactante y del Niño Pequeño. [on line], Disponible desde <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9243562215.pdf> [Acceso 20 de Junio 2014].
- Penttila, I. A., A. B. Van Spriel, et al. (1998). "Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum". Pediatr Res 44(4): 524-531.
- Pérez, L., A. M. Viada, et al. (1980). "Determinacion de inmunoglobulinas en calostro humano". Rev Chil Pediatr 51(2): 117-120.
- Permanyer, M., C. Castellote, et al. (2010). "Maintenance of breast milk Immunoglobulin A after high-pressure processing". J Dairy Sci 93(3): 877-883.
- Picciano, M. F. (2001). "Nutrient composition of human milk". Am Pediatr Clin North 48(1): 53-67.
- Playford, R. J., C. E. Macdonald, et al. (2000). "Colostrum and milk-derived peptide growth for the treatment of gastrointestinal disorders". Am J Clin Nutr 72(1): 5-14.
- Prokesova, L., R. Lodinova-Zadnikova, et al. (2006). "Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life". Pediatr Allergy Immunol 17(3): 175-183.

- Ramírez-Santana, C., F. J. Pérez-Cano, et al. (2012). "Effects of cooling and freezing storage on the stability of bioactive factors in human colostrums". J Dairy Sci 95(5): 2319-2325.
- Rodriguez-Palmero, M., B. Koletzko, et al. (1999). "Nutritional and biochemical properties of human milk: II. Lipids, micronutrients, and bioactive factors". Clin Perinatol 26(2): 335-359.
- Ronayne de Ferrer, P. A., N. H. Slobodianik, et al. (1984). "Immunoglobulin A level in human milk from mothers delivering preterm". Am J Clin Nutr 40(3): 465-467.
- Ruiz-Palacios, G. M., J. J. Calva, et al. (1990). "Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk". J Pediatr 116(5): 707-713.
- Schanler, R. J., N. M. Hurst, et al. (1999). "The use of human milk and breastfeeding in premature infants". Clin Perinatol 26(2): 379-398.
- Shi, Y. D., G. Q. Sun, et al. (2011). "The chemical composition of human milk from Inner Mongolia of China". Food Chem 127(3): 1193-1198.
- Souza, S. G., I. Delgadillo, et al. (2014). "Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrums". Food Chem 151: 79-85.
- Tomicic, S., G. Johansson, et al. (2010). "Breast Milk Cytokine and IgA Composition Differ in Estonian and Swedish Mothers-Relationship to Microbial Pressure and Infant Allergy". Pediatr Res 68(4): 330-334.
- Tully, D. B., F. Jones, et al. (2001). "Donor milk: What's in it and what's not". J Hum Lact 17(2): 152-155.
- Underwood, M. A. (2013). "Human milk for the premature infant". Am Pediatr Clin North 60(1): 189-207.
- Untalan, P. B., S. E. Keeney, et al. (2009). "Heat susceptibility of interleukin-10 and other cytokines in donor human milk". Breastfeed Med 4(3): 137-144.
- Viazis, S., B. E. Farkas, et al. (2007). "Effects of High-pressure processing on immunoglobulin A and lysozyme activity in human milk". J Hum Lact 23(3): 253-261.
- Viazis, S., B. E. Farkas, et al. (2008). "Inactivation of bacterial pathogens in human milk by high-pressure processing". J Food Prot 71(1): 109-118.
- Walterspiel, J. N., A. L. Morrow, et al. (1994). "Secretory anti-*Giardia lamblia* antibodies in human milk: protective effect against diarrhea". Pediatrics 93(1): 28-31.
- Wight, N. E. (2001). "Donated human milk for preterm infants". J Perinatol 21(4): 249-254.

8. Anexo

8.1. Criterios de selección de las donantes del Banco de leche humana (BLH)

Criterios de inclusión

- Madres saludables en periodo de lactancia, con edades comprendidas entre 18 y 38 años.
- Las donantes deben ser madres sanas que estén amamantando o extrayendo leche para su hijo con secreción láctea superior a las exigencias de su hijo, que estén dispuestas a donar el excedente en forma voluntaria.
- Madres que cuenten con exámenes serológicos negativos para HIV, Hepatitis B, Sífilis (controles pre y posnatal), no consuman medicamentos contraindicados para la lactancia, alcohol, no fumen y cumplan con las normas de higiene pedidas para la extracción y conservación de la leche.

Criterios de exclusión

- Muestras de Leche que cumplieran con los criterios de rechazo organoléptico (aspecto, color, olor); muestras con valor de acidez igual o mayor a 8°D, donantes que no hayan cumplido con las especificaciones dadas por la Red Nacional de Bancos de Leche Humana FIOCRUZ/IFF-BLH. www.redeblh.fiocruz.br.

8.2. Formulario de consentimiento informado

“Valoración de componentes con actividad inmunológica y efectos de la pasteurización en calostros donados en el banco de leche humana Dr. Ruben Panizza”.

Le estamos solicitando autorización para participar de un estudio de investigación. Antes de decidir si quiere o no participar, es importante que entienda por qué el estudio está siendo realizado y como se va a desarrollar en caso que Ud. esté de acuerdo en participar. Por favor, lea con atención la información que sigue, y si necesitan, soliciten información a los técnicos encargados de este estudio. Si desean, discutan este trabajo con su familia. Siéntanse libres de preguntar cualquier cosa que no les sea clara o de la cual deseen más informaciones.

Muchas gracias por leer estas líneas.

Propuesta:

¿Cuál es el propósito de este estudio?

El propósito de este estudio multidisciplinario plantea como objetivo general mejorar la calidad inmunológica de la leche obtenida a través de la donación al Banco de Leche Humana (BLH); se desarrollará colaborativamente entre la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias, la Cátedra de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Química y el BLH del Centro Hospitalario Pereira Rossell (CHPR).

¿Por qué fuimos escogidos?

Ud. fue seleccionada por su participación voluntaria en la donación de leche humana excedente al BLH para la nutrición de los prematuros internados.

Procedimientos:

¿Qué ocurrirá si nosotros participamos del estudio?

Se solicitará autorización que de la leche que Ud. dona, 12 mL sean utilizados para realizar estudios pre y post tratamiento térmico, para poder valorar los cambios que se producen en los componentes bioactivos (proteínas, inmunoglobulinas).

¿Qué tengo que hacer yo?

Ud. tendrá, en caso que esté de acuerdo en participar, que firmar este consentimiento informado.

Riesgos e incomodidades:

¿Cuáles son las posibles desventajas y riesgos de participar en el estudio?

No existe riesgo en participar de este estudio.

Si tienen alguna duda, deben contactar al técnico encargado del estudio, que no se incomodará en complementar la información que se le ha dado.

¿Cuáles son los efectos colaterales de nuestra participación?

No existen riesgos colaterales.

Beneficios:**¿Cuáles son los posibles beneficios de participar en el estudio?**

Las informaciones que obtenemos en el estudio pueden ayudar al mejor crecimiento y desarrollo de su hijo/hija y de muchos recién nacidos en el futuro.

Confidencialidad y uso de las informaciones recolectadas:**¿Nuestra participación en este estudio será confidencial?**

Si Ud. está de acuerdo en participar en el estudio, todos los registros médicos pueden ser examinados por las autoridades reguladoras, para comprobar que el estudio está siendo realizado de una manera correcta. Su nombre y otros datos de contacto no serán revelados fuera del hospital.

¿Qué va a pasar con los resultados de la investigación?

Los resultados de la investigación, serán usados de manera rutinaria en la atención de los recién nacidos. También podrán ser publicados en revistas médicas, presentados en congresos, publicados en páginas web científicas, pero la identidad de Ud. o del niño no podrán ser hechas pública en ninguna de estas formas de difusión.

Costos:

Ud. no recibirá ningún dinero por su participación en el estudio, pero tampoco tendrán ningún gasto adicional por participar en el mismo. En caso de que se necesite alguna consulta o examen por motivos supuestamente relacionados al estudio, éstos serán hechos sin ningún costo para Ud.

¿Quién financia la investigación?

La misma se realiza en forma colaborativa entre la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias, la Cátedra de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Química y el BLH del CHPR.

Participación:**¿Estamos obligados a participar del estudio?**

Su participación en el estudio es voluntaria. Si prefiere no participar, no tiene que presentar ninguna justificación. También, durante el desarrollo del estudio, Ud. podrá desistir de participar en cualquier momento, basta que Ud. comunique su decisión al equipo técnico.

¿Quién autorizó la realización del estudio?

El estudio fue revisado por el Comité de Ética en Investigación del CHPR. En caso de cualquier duda del aspecto ético, Ud. podrá contactar al:

Lic. Laboratorio Clínico Arturo Puyol del BLH (Tel. 27066050).

Contacto para informaciones adicionales:

Siempre que Ud. quisiera obtener más informaciones sobre este estudio, por favor entre en contacto con:
Dra. Mara Castro del BLH (Tel. 27066050).

Muchas gracias por participar de este estudio. Ud. recibirá una copia del formulario de consentimiento firmado, que Ud. podrá conservar.

Página de firmas

Fecha: / /

Titulo del estudio:

“Valoración de componentes con actividad inmunológica y efectos de la pasteurización en calostros donados en el banco de leche humana Dr. Ruben Panizza”.

Nombre del investigador: Lic. Laboratorio Clínico Arturo Puyol, Dra. Mara Castro.

Confirmando haber leído y entendido los términos del consentimiento y autorizo el uso de parte de la leche donada en forma voluntaria para realizar el estudio descrito más arriba.

Tuve la oportunidad de hacer preguntas y esclarecer todas las dudas en la conversación mantenida.

Concuerdo en participar en el estudio antes descrito.

.....
Nombre de la mujer
C. I.

.....
Firma de la mujer

.....
Nombre del investigador
C. I.

.....
Firma del investigador