

28

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"



EXTRACCION, ESTERILIZACION Y LIOFILIZACION
DE LECHE MATERNA HUMANA.

T E S I S

Para Obtener el Titulo de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P r e s e n t a :
JUAN RUBEN MORALES MONTIEL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E:

=====

| | PAG. |
|--|------|
| CAPITULO UNO. INTRODUCCION. | |
| Introducción..... | 1 |
| Planteamiento del Problema..... | 2 |
| Objetivos..... | 3 |
| Hipótesis..... | 4 |
| CAPITULO DOS. GENERALIDADES. | |
| Generalidades..... | 5 |
| Proteínas..... | 8 |
| Inmunoglobulinas..... | 10 |
| Leucocitos Polimorfonucleares..... | 16 |
| Vitaminas..... | 19 |
| Sodio..... | 22 |
| Potasio..... | 25 |
| Calcio..... | 26 |
| CAPITULO TRES. RECURSOS. | |
| Material Humano..... | 28 |
| Material y Equipo..... | 29 |
| Reactivos..... | 31 |
| CAPITULO CUATRO. METODOS. | |
| Obtención del Producto Biológico..... | 33 |
| Liofilización..... | 34 |
| Proteínas Totales (Biuret)..... | 35 |
| Sodio (Flamometría)..... | 36 |
| Potasio (Flamometría)..... | 36 |
| Calcio (Ferro-Ham)..... | 37 |
| Inmunoglobulinas (Inmuno-Difusión-Radial)..... | 39 |
| Células (Papanicolau)..... | 40 |
| CAPITULO CINCO. RESULTADOS. | |
| Resultados..... | 42 |
| Análisis de Resultados..... | 51 |
| CAPITULO SEIS. | |
| CONCLUSIONES..... | 52 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 53 |

INTRODUCCION

El pecho materno ha sido el modo principal de alimentación de los lactantes en todo el mundo, desde el comienzo de la historia humana y hasta el siglo - XX.

Tengase presente que en los viejos tiempos no había alguna otra fuente como alternativa, para substituir el pecho de la madre, y así muy pocos lactantes o ninguno sobrevivían si no eran alimentados con leche de la madre o de alguna otra mujer.

La utilización de una nodriza era la única alternativa cuando la madre no - podía dar el pecho al hijo, ésta es todavía la situación en muchos países en desarrollo, donde la alimentación al pecho es cuestión de vida o muerte para la criatura.

La leche del pecho representa una forma importante de nutrientes para el bebé esencialmente en los países o los países, en los cuales no pueden dispo- nerse de substitutos adecuados de la leche materna, por motivos económicos, - para la mayor parte de la población.

Solamente durante las últimas décadas los especialistas en nutrición, y químicos de los alimentos, han empezado a trabajar para producir otras fuentes de alimento destinadas a los recién nacidos.

Los primeros intentos para crear fórmulas de leches registradas como substi- tuto artificial de la leche materna, se atribuye a "Ruhly y Gerstenberger", - en 1919. Desde entonces la tecnología de los alimentos ha permitido produ- cir fórmulas de leche de patente que se parecen más a la leche humana. La - disponibilidad de refrigeradores, la preparación de biberones y pezones mejo- rados, han logrado un número creciente de tipos diversos de fórmulas para lac tantes que hay en el mercado y han cambiado radicalmente el modo de alimen tación de los niños.

La mayor parte de estas fórmulas se basan en la leche de vaca e intentan - utilizarse como única fuente de nutrientes para el lactante en periodo neona tal y durante los primeros meses de vida.

Los datos disponibles indican que los efectos a corto plazo de la alimenta- ción con biberón en países industrializados suelen ser buenos.

Se sabe muy poco acerca de los efectos a largo plazo, o de cual sea la fór-

mula óptima de alimentar a los lactantes. Se ha dicho que la alimentación con substitutos de leche materna representa, con mucho, el mayor experimento en vivo efectuado sin una serie de controles.

Aún cuando una parte de la población de lactantes reciben el beneficio de la leche materna, existen circunstancias que ocasionan que la alimentación materno no se lleve a cabo, como son:

Prejuicios estéticos proliferados en nuestra sociedad, madres que por necesidad trabajan la mayor parte del día, fallecimiento de la madre durante el parto, recuperación tardía de la madre post-parto, padecimiento neurológico superior de la madre, cáncer mamario o afección a las mamas, antecedentes de tuberculosis reciente, medicamentos ingeridos por la madre, que pueden ocasionar alguna afección al lactante, intolerancia a los disacaridos por parte del lactante, prematuz del lactante, labio leporino y paladar hendido, etc., lo que hace necesario contar con leches que favorezcan la nutrición del lactante.

Se encuentran en el mercado leches maternizadas que si bien cubren con algunos requisitos nutricionales no tienen la capacidad de dar protección inmunológica. Por lo que se considera necesario probar un método eficaz y suficientemente confiable que permita la conservación a largo tiempo de la leche humana y así mismo preserve las características nutricionales e inmunológicas.

Para este fin, el método de elección es el de liofilización, puesto que este es un método que se ha utilizado para la conservación de productos biológicos, que son sensibles al calor y en nuestro caso el producto que se ha utilizado es también sensible al calor.

Planteamiento del problema

La leche humana después de ser colectada por succión, pierde su contenido - en elementos nutritivos e inmunológicos después de 24 hrs., por esto es necesario almacenarla mediante un método de conservación, el cual nos permite - que el producto este en un estado óptimo a largo plazo.

Antes y después de empleando el método elegido es necesario cuantificar, el contenido proteico, celular, inmunológico, de calcio, sodio y potasio, etc., para determinar la eficacia del mismo.

Objetivos

- 1.- Conservar el producto biológico en su estado óptimo.
- 2.- Determinar si el método de conservación elegido es el óptimo mediante la obtención de algunas de las características originales del producto.
- 3.- Aplicar procedimientos para la cuantificación de los componentes nutricionales e inmunológicos, los cuales sean confiables para el producto -- biológico.

HIPOTESIS

El método de liofilización, es el de elección para la conservación de las características originales de la leche humana, puesto que es uno de los más utilizados para la conservación de productos biológicos, los cuales son sensibles al calor.

GENERALIDADES

Se ha demostrado claramente que la leche humana, principal producto de secreción de las glándulas mamarias en lactancia, posee una riqueza de componentes nutritivos e inmunológicos celulares y solubles, así como otros factores que median los mecanismos no específicos de defensas contra agentes específicos.

Las sustancias solubles que se observan en la leche humana, incluyen componente secretor IgA, (11s), (7s), IgM e IgG, en menor grado IgE e IgD de inmunoglobulinas, los componentes principales del sistema de complemento, lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima, factores quimiotácticos, factor bifido, lípidos relacionados con factores de resistencia estafilococcica, monoglicéridos que contienen actividad antiviral e inhibidores de alfa-anti tripsina y proteasa (ver tabla I y II).

TABLA I.- Concentración de factores solubles en mg/día, semanas, post-parto.

| Inmunoglobulina | 1a. | 2a. | 3a. | 4a. |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| IgG | 50 | 25 | 25 | 10 |
| IgA | 5 000 | 1 000 | 1 000 | 1 000 |
| IgM | 70 | 30 | 15 | 10 |
| Lisozima | 50 | 60 | 60 | 100 |
| Lactoferrina | 1 500 | 2 000 | 2 000 | 1 200 |

TABLA II.- Aspectos de la actividad antimicrobiana en leche humana.

| CONTRA BACTERIAS | CONTRA VIRUS | CONTRA HONGOS |
|-------------------------|-----------------|---------------|
| Enterobacteracea | Enterovirus | Candida |
| Enterotoxina de E. coli | Polio 1,2,3 | |
| Clostridium tetani | Coxsachie A,B | |
| Difteria | Echo 6,9 | |
| Steptococcus pneumonie | Rotavirus | |
| Salmonella | Herpes simple | |
| Staphylococcus aureus | Influenza | |
| Vibrio Cholerae | Arbovirus | |
| | Sialiki forest | |
| | Ross River | |
| | Japanese B | |
| | Dengue | |
| | Rubeola | |
| | Sincicial Resp. | |

Además, en la leche humana se ha identificado gran variedad de sustancias - inmunorreguladoras, incluyendo el factor inhibidor de imigración de macrófagos, factores estimulantes de la IgA, interferón y sustancias inmunosupresoras de células T, así como numerosos componentes celulares.

Estos últimos incluyen fagocitos, monocitos, macrófagos, células T, células plasmáticas, leucocitos, polimorfonucleares y células epiteliales.

TABLA III.- Componentes celulares de la leche humana en Post-parto temprano (hasta los 28 días).

| TIPO DE CELULAS | Núm. POR mm ³ PROMEDIO | % DE CELULAS TOTALES PROMEDIO |
|---------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Macrófagos | 2 140 | 66 |
| Polimorfonucleares | 560 | 21 |
| Linfocitos | 240 | 11 |
| Células epiteliales | 20 | 1-2 |

A continuación se describen los componentes nutritivos presentes en leche humana (tabla IV).

TABLA IV.

| | | | | | |
|--------------------|-----|-----------------|-----|-----------------------|------|
| Energía (kcal) - - | 690 | Calcio (mg) - - | 340 | Vit. A (VI) - - - - | 1989 |
| Proteínas (gr) - - | 9 | Fósforo (meq) - | 140 | Tiamina (mg) - - | 160 |
| Grasa (gr) - - - | 45 | Sodio (meq) - - | 7 | Riboflavina (mg) | 360 |
| Carbohidratos (gr) | 68 | Potasio (meq) - | 13 | Niacina (mg) - - | 1.5 |
| Lactosa (gr) - - - | 68 | Cloruro (meq) - | 11 | Pinedocina (mg)- | 100 |
| Cenizas (gr) - - - | 2 | Hierro (mg) - - | | Ac. Fólico (mg)- | 52 |
| | | | | Vit. B12 (mg) - - - | 0.3 |
| | | | | Vit. C (mg) - - - - | 43 |
| | | | | Vit. D (VI) - - - - | 22 |
| | | | | Vit. E (VI) - - - - | 2 |
| | | | | Vit. K (mg) - - - - | 15 |
| | | | | Nitrógeno total - - - | 1.93 |

Considerando los elementos de importancia presentes en la leche humana se realiza una descripción acerca de sus propiedades y utilidades. (con respecto al trabajo realizado).

(1,5,9,15,22)

PROTEINAS

Las proteínas son compuestos orgánicos determinantes en la dinámica metabólica celular y extra-celular del organismo.

Estructuralmente componen del 15% - 20% del cuerpo animal. Forman parte de las membranas celulares y de ciertos orgánulos citoplásmicos como ribosomas y mitocondrias. El núcleo contiene histonas y proteínas residuales formando parte de los cromosomas. La actina y la miosina sintetizada por las fibras musculares, forman parte del músculo y del mecanismo que produce la contracción muscular.

Funcionalmente, las proteínas forman parte total o parcial de la molécula de varios de los compuestos esenciales del organismo. Las enzimas que catalizan todas las reacciones metabólicas del organismo; los anticuerpos que le protegen de agentes patógenos y sustancias alergenos y en ciertas hormonas como la insulina del páncreas y la vasopresina de la neurohipófisis, son proteínas.

La púrpura visual o rodopsina, contenida en la parte externa de las células cilíndricas de la retina del ojo, esta compuesta por una proteína y un pigmento carotenoides.

El organismo mamífero almacena hierro en el hígado, en forma de una proteína llamada ferritina. También son proteínas la hemoglobina, que es el pigmento de la sangre, así como el fibrinógeno y la protombina del plasma sanguíneo que forman parte del mecanismo de coagulación de la sangre.

Además, las proteínas son fuente de energía, forman parte del mecanismo de amortiguadores del pH por su naturaleza anfotérica y regulan el balance osmótico del organismo. Por lo tanto podemos concluir que las proteínas son determinantes de la homeostasis.

Químicamente las proteínas son polímeros largos y complejos de aminoácidos, compuestos orgánicos, formados de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Los 20 aminoácidos de importancia biológica contiene un grupo amino (NH_2), - un grupo carboxilo (COOH) y una cadena lateral simbolizada con una R en la fórmula estructural general para un aminoácido.

El grupo amino tiene propiedades básicas y el grupo carboxilo ácidas.

Al ser ionizados el grupo amino y el carboxilo, el aminoácido tiene cargas

(+) y (-) (son compuestos anfotéricos), que pueden funcionar como amortiguadores de pH. La cadena lateral del aminoácido es la que le da la identidad a cada uno de ellos.

Este puede constar de un átomo de hidrógeno, como en el caso de la glicina o bien compleja como el triptófano.

La molécula de proteína se forma mediante el eslabonamiento de los aminoácidos en orden lineal, el enlace entre 2 aminoácidos para formar una cadena, - se efectúa mediante una reacción de condensación entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del otro. Este tipo de enlace químico se denomina enlace peptídico.

Podemos concluir que una molécula de proteína es una cadena de polipeptidos que se inicia con un grupo amino y termina con un grupo carboxilo, los 20 aminoácidos componentes de las proteínas son:

Alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, trionina, triptófano, tirosina y valina.

Es bien conocida la necesidad de proteína, especialmente de sus aminoácidos constituyentes, para sintetizar las proteínas corporales.

Hay 10 u 8 aminoácidos necesarios para la síntesis de proteína tisular que no son sintetizadas por el cuerpo y por lo tanto deben obtenerse de la dieta. Estos aminoácidos son histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, trionina, triptófano, valina y arginina.

Datos recientes sugieren que la cistina y la taurina también pueden ser especialmente indispensables sobre todo para lactantes prematuros.

El contenido proteico del cuerpo aumenta de 11.6 a 14.6 por ciento durante el primer año de vida. Esto se acompaña de un aumento de 2-7 Kg., de peso corporal.

La recomendación para proteína durante la infancia se basa en la cantidad de proteína que contiene la leche materna y que asegura un ritmo satisfactorio de crecimiento. La cantidad estimada para el primer mes de vida es de aproximadamente 2 - 2.4/kg/día, que disminuye hasta 1.5/kg, por día a la edad de 6 meses.

La requisición para proteínas es de 1.2gr/kg de peso corporal para lactantes de 0 - 6 meses, y de 2.2/kg para lactantes de 6 - 12 meses.

(6,11,7,0,14,18,31)

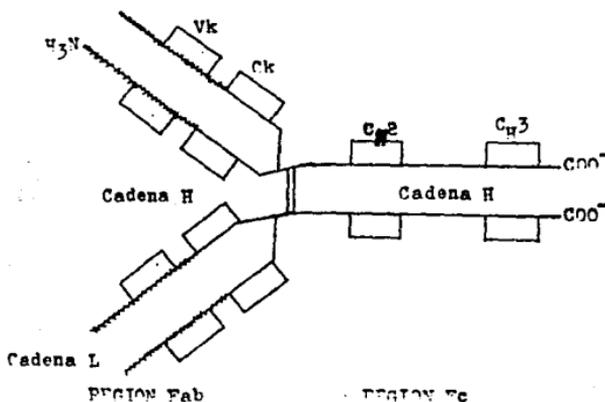
INMUNOGLOBULINA

El sistema inmunológico está expresado en dos componentes principales: la inmunidad celular por medio de la célula Fagocíticas y T, y la inmunidad humoral expresada a través de proteínas plasmáticas, anticuerpos o inmunoglobulina.

Las inmunoglobulinas son las moléculas proteicas que pueden portar actividades de anticuerpos, es decir, la propiedad de combinarse específicamente con la sustancia que provoca su formación, la cual es denominada antígeno.

Las inmunoglobulinas son gluco-proteínas compuestas de 82 - 96%, de polipéptidos y de 4 - 18%, de carbohidratos. El componente peptídico es el que posee casi todas las propiedades biológicas asociadas con la molécula del anticuerpo. Los anticuerpos son moléculas difuncionales y juntas, de manera específica con el antígeno, inician toda una gama de fenómenos secundarios como la fijación del complemento y la liberación de histamina por las células cebadas que son independientes de su especificidad por el antígeno.

Los conocimientos actuales de la estructura de las inmunoglobulinas nos dice que existen hasta hoy 5 inmunoglobulinas conocidas, de las cuales mediante un esquema se mostrará su estructura básica.



Las moléculas de inmunoglobulinas están compuestas de un número igual de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras, que pueden representarse por la fórmula general $(H_2L_2)_n$. Las cadenas son mantenidas unidas por fuerzas no covalentes y habitualmente por puentes disulfuro covalente, intercadenas que forman una estructura simétrica bilateral. Se ha mostrado que todas las inmunoglobulinas normales tienen esta estructura básica, aunque algunas como se verá están compuestas de más de una unidad de 4 cadenas.

Cada cadena polipeptídica está constituida de numerosos dominios o asas de un tamaño bastante constante (100-110 residuos de aminoácidos), formados por los enlaces disulfuro intracadena. El dominio N-terminal de cada cadena muestra mucha mayor variación en la secuencia de aminoácidos que las otras y se designa como la región variable para distinguirla de los otros dominios relativamente constantes (denominados en forma colectiva la región constante en cada cadena). La zona donde las regiones variables y constantes se unen se denomina "región interruptora".

Las inmunoglobulinas son bastante insensibles a la digestión proteolítica, pero son fragmentadas con máxima facilidad alrededor de la mitad de la cadena pesada en una zona entre el primero y el segundo dominio constante (CH_1 y CH_2). La enzima papaína hiende la molécula sobre el lado N-terminal de los enlaces disulfuro intracadena pesada, en 3 fragmentos de tamaño semejante: dos fragmentos Fab que incluyen una cadena ligera completa y los dominios VH y CH_1 de una cadena pesada, y un fragmento Fc, compuesto de las mitades de C-terminal de las cadenas pesadas.

Si se emplea pepsina el hendimiento ocurre sobre el lado C-terminal de los enlaces disulfuro intercadenas H, proporcionando un gran fragmento $F(ab')_2$ compuesto de aproximadamente 2 fragmentos Fab.

El fragmento Fc es degradado extensamente por la pepsina. La región en la cadena H susceptible del ataque proteolítico es más flexible y está más expuesta al medio que los dominios globulares más compactos y se conoce como la "región de la bisagra". La actividad ligada al antígeno está asociada con los fragmentos Fab o más específicamente con los dominios VH y V_L , mientras que la mayor parte de las actividades biológicas secundarias de las inmunoglobulinas (por ejemplo, la fijación del complemento), están asociadas con el fragmento Fc.

Como ya se expresó, las moléculas de inmunoglobulinas incluyen una familia de proteínas con la misma arquitectura molecular básica, pero que muestra un vasto arreglo de especificidades ligadas al antígeno y diferentes actividades biológicas.

Estas actividades diferentes son, por supuesto, el reflejo de diferencias estructurales dictadas por la secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas. Esta heterogeneidad estructural ha sido un obstáculo para los químicos de las proteínas, pero los plasmacitomas de origen, murino y humano proporcionan inmunoglobulinas homogéneas (monoclonales), que han facilitado grandemente el estudio de la secuencia de los aminoácidos de las moléculas de anticuerpos.

Todas las cadenas L tienen un peso molecular de aproximadamente 23,000 que pueden clasificarse en 2 tipos, kappa (κ) y lambda (λ), sobre la base de múltiples diferencias estructurales en las regiones constantes que se reflejan en las diferencias antigénicas. Los dos tipos de cadenas L han sido halladas en muchas especies de mamíferos. Además las homologías de la secuencia de aminoácidos entre las cadenas k del ratón y del humano son mucho mayores que las homologías entre las cadenas k y dentro de cada especie, indicando que los 2 tipos se separaron durante la evolución antes de la divergencia de las especies de mamíferos.

La proporción de las cadenas κ y λ , en las moléculas de inmunoglobulinas varían de una especie a otra, siendo aproximadamente de 2:1 en el humano. Una inmunoglobulina determinada contiene siempre cadenas κ ó λ pero, nunca una mezcla de las dos.

Se han hallado cinco clases de cadenas H en el humano, basadas en diferencias de estructura de las regiones constantes, descubiertas por métodos serológicos y químicos. Las formas diferentes de cadenas H, designadas como δ , γ , α , μ , y ϵ , varían en su peso molecular desde 50 a 70 mil; las cadenas μ y ϵ . La cadena delta tiene un peso molecular intermedio que se considera que sea debido a una región extendida de bisagras. En forma semejante, la cadena γ_3 tiene una región extendida de bisagras que consiste en aproximadamente 60 residuos de aminoácidos, incluyendo 14 cisteínas, que aplican el gran número de enlaces disulfuro intercadena de IgG3.

La clase de la cadena H determina la clase de la inmunoglobulina. Por lo

tanto, hay cinco clases de inmunoglobulinas:

IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Dos cadenas gamma combinadas con dos cadenas L, κ o λ , constituyen una molécula IgG, la mayor clase de las inmunoglobulinas en el suero.

En forma semejante, dos cadenas μ y dos cadenas L forman una sub-unidad IgM; las moléculas IgM son macroglobulinas que consisten en 5 sub-unidades básicas de 4 cadenas.

La IgA es polidispersada, comprendiendo de 1-5 de dichas unidades.

Las otras clases IgD e IgE a semejanza de IgG consisten en una sola unidad de 4 cadenas.

CARACTERISTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS CON RESPECTO A SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA

IgG

En los adultos el valor de esta inmunoglobulina es de un 75% aproximadamente del total de las inmunoglobulinas del suero. Dentro de la clase IgG hay 4 sub-clases y sus concentraciones aproximadas son:

IgG 1 = 60 = 70%

IgG 2 = 14 = 20%

IgG 3 = 4 = 8%

IgG 4 = 2 = 6%

Las cuales varían según la persona. Esta inmunoglobulina es la única que puede atravesar la placenta en el humano y la responsable del recién nacido durante los primeros meses de vida. Las sub-clases no están dotadas en igual forma con esta propiedad.

También es fijar el complemento otra de sus funciones. Los macrófagos portan sobre la superficie, receptores que enlazan a IgG1 e IgG3 y su fragmento Fc es el responsable del enlace a los macrófagos los cuales, entonces ya pueden funcionar fagocitando. El peso molecular de la IgG es de 1,500 UI.

IgA

Es la inmunoglobulina predominante en las secreciones corporales.

Cada molécula de IgA secretora se compone de 2 unidades básicas, de n cadena, una molécula de componente secretor y de cadena J. El peso molecular de la IgA secretora es aproximadamente de 400,000.

La IgA secretora, proporciona el mecanismo de defensa primaria contra la infección local, debido a su abundancia en la saliva, las lágrimas, mucosa nasal, líquido prostático, secreciones vaginales, bronquiales y mucosas del intestino delgado.

Su acción principal es la de impedir la entrada de los antígenos al sistema inmunitario general y la destrucción de este antígeno.

Esta normalmente existe en el suero en forma monomérica y polimérica constituyendo aproximadamente 15% del total de las inmunoglobulinas séricas.

IgM

Constituye aproximadamente el 10% de las inmunoglobulinas y por lo general existe como pentámero con un peso molecular aproximado de 900,000 (11s).

Los anticuerpos IgM son propiamente prominentes, es la respuesta inmunitaria inicial a la mayoría de los antígenos y predominan en ciertas respuestas de anticuerpos, como los grupos sanguíneos.

Es una de las inmunoglobulinas de mayor manifestación sobre las superficies de las células B. A su vez es la fijadora del complemento más eficaz, ya que una sola molécula de complemento basta para iniciar la cascada del complemento.

IgD

La molécula de ésta inmunoglobulina es un monomero y su peso molecular es de 180,000 (17S-80) aproximadamente. Esta inmunoglobulina está presente de manera normal en el suero en cantidades mínimas (0.2%).

Es relativamente lábil a la degradación por el calor y las enzimas proteolíticas. Existen algunos reportes de IgD con actividad de anti-cuerpo para -

ciertos antígenos incluyendo la insulina, penicilina, proteínas de la leche, toxoide diftérico, antígenos nucleares y tiroideo.

No obstante su acción no ha sido aún determinada. La IgD es la otra que predomina en los linfocitos humanos y se ha sugerido que la IgD puede hallarse involucrada en la diferenciación de estas células.

IgE

La identificación de los anticuerpos IgE como reagentes y la caracterización de esta clase de inmunoglobulinas marcó un mayor avance en el estudio de los mecanismos involucrados en las enfermedades alérgicas.

La IgE, tiene un peso molecular aproximado de 190,000 (85). Comprende solo 0.004% del total de las inmunoglobulinas séricas, pero se liga con gran afinidad a las células cebadas, a través de un sitio en la región Fc.

Al combinarse con ciertos antígenos específicos llamados alérgenos, los anticuerpos IgE desencadenan la liberación, a partir de las células cebadas, de los mediadores farmacológicos responsables de la roncha y de las reacciones de brote urticarial sobre la piel, evocadas por la exposición de la piel de los individuos alérgicos a los alérgenos.

Los anticuerpos IgE proporcionan un ejemplo notorio de la naturaleza, bifuncional de las moléculas de los anticuerpos. Estas inmunoglobulinas existen en forma monomérica.

Las inmunoglobulinas de la leche son cuantitativa y cualitativamente diferentes de las que existen en el suero. Estudios clínicos y epidemiológicos sugieren fuertemente la existencia de una función protectora de éstas.

La inmunoglobulina que predomina en la leche es IgA principalmente, como - IgA secretora, ésta difiere de la IgA del suero; está formada por 2 moléculas de IgA unidas en forma covalente con el polipeptido, en "componente secreto" y la cadena de unión J.

A partir de la IgA secretoria hay en la leche principalmente otras dos inmunoglobulinas que son la IgG y la IgM.

(1, 3, 6, 7, 8, 10, 18, 21, 27, 28, 30).

Función de los Leucocitos Neutrofilos Polimorfonucleares

El neutrófilo maduro humano es una célula de etapa final que una vez liberado de la médula ósea circula con una vida media de 6 - 7 horas antes de perder su capacidad funcional, abandonando el cuerpo de manera aleatoria no relacionada con la edad, alrededor de mil seiscientos millones de neutrofilos son recambiados diariamente. La liberación de granulocitos en el interior de la sangre periférica parece que está relacionada con la necesidad celular y la deformidad y un factor liberador que puede actuar sobre los sinusoides de la médula ósea.

Forma de actuar del PMN, ¹Ac, y ⁴C, en la destrucción de un agente patológico.

El Ac, específico puede actuar como opsonina, el Ac., se combina con los polisacáridos antigenicos de la superficie del neumococo, a través de sitios de combinación del Ac. Localizado sobre la porción Fab de ésta molécula de Ig. La porción Fc de la molécula, que actua para que la Ig funcione como una opsonina se libera para adherirse a los sitios receptores Fc, sobre la superficie de los fagocitos completando en esta forma un puente entre las bacterias y el fagocito.

El Ac específico actuando con el C a través de la vía clásica C1, C4, C2, - puede promover la opsonización microbiana. Aquí una gran cantidad de Ac al parecer insuficiente para opsonizar por sí mismo, activa C.

Los sitios receptores del C activado se encuentran sobre la superficie de los fagocitos. El C3 activado sobre la superficie de las bacterias sirve como puente entre la bacteria y el fagocito acelerando su ingestión.

*Polimorfonuclear

¹Anticuerpo

⁴Complemento

Otra estructura que entra en juego dentro de la respuesta inmune son los macrófagos, los cuales varían en su tamaño y morfología. El núcleo es ovalado en forma de riñón y es exéntrico cuando se ha visto con microscopio electrón-

nico, se ha observado que la membrana celular es triple con muchas protuberancias e invaginaciones.

El citoplasma contiene membrana de retículo endoplásmico, con ribosomas insertados, mitocondrias en forma de bastón y cuando menos 2 tipos de vacuolas; vesículas pinocíticas pequeñas y vacuolas fagocíticas de mayor tamaño. Hay numerosas lisozimas que son vesículas que contienen enzimas hidrolíticas que se manifiestan a través de citoplasma. El núcleo tiene una cromatina semejante a una banda alrededor de la membrana nuclear, tiene una región de , compuesta por uno o más centriolos rodeados por el aparato de Golgi. Los microtubulos se estiran por todo el citoplasma hasta la membrana celular, generalmente ésta es la estructura de los macrófagos, aunque cambian un poco según el sitio en donde se encuentran dentro del cuerpo humano.

Dichas células tienen la capacidad de engullir y destruir a los microorganismos (fagocitosis) patógenos y se ha demostrado que no sólo son importantes en la defensa contra los patógenos, sino que desempeñan una parte esencial en toda una gama de otros procesos inmunológicos incluyendo la sensibilización de los linfocitos, la regulación de las respuestas de los linfocitos y la resistencia de las células tumorales.

MECANISMOS DE DESTRUCCION (de los PMN)

A.- Sistemas dependientes de oxígeno

1.- Sistemas dependientes de Nucleoperoxidasa

- a).- Mieloperoxidasa
- b).- $H_2 O_2$
- c).- Haluros
- d).- pH ácido

2.- Sistema independientes de la Mieloperoxidasa

- a).- $H_2 O_2$

- b).- Anión superóxido
- c).- Oxígeno único
- d).- Radical Hidroxilo

B.- Sistemas independientes de Oxígeno

- 1.- Proteínas cationicas
- 2.- Lactoferrina
- 3.- Lisozimas
- 4.- pH bajo
- 5.- Histonas de núcleo.

(3,6,7,8,10,12,28,30).

VITAMINAS

Las vitaminas son compuestos requeridos para el crecimiento normal y el mantenimiento de la vida en los animales, incluido el hombre.

Como regla general, los animales son incapaces de sintetizar estos compuestos mediante procesos anabólicos independientes del medio, además del aire. Estos compuestos son efectivos en pequeñas cantidades, no proporcionan energía y no son empleados como unidades en la formación de las estructuras del organismo, pero son esenciales para la transformación de energía y para la regulación del metabolismo de las unidades estructurales. Estos compuestos o sus precursores se encuentran en los vegetales y por lo que se conoce, cumplen funciones metabólicas específicas en las células vegetales. Los tejidos de los vegetales son la fuente de estos factores protectores nutricionales para el reino animal.

Además de carbohidratos, grasas, proteínas, sales minerales y agua es necesario que el alimento del hombre y los animales contenga pequeñas cantidades de estas sustancias orgánicas denominadas vitaminas.

Si uno cualquiera de por lo menos 13 de estos compuestos falta en la dieta, se produce una reducción o determinación total del crecimiento en los niños y síntomas de desnutrición conocidos como enfermedades carenciales o por deficiencia.

Las vitaminas se diferencian entre sí por su composición química y función, pero comparten la característica de que ninguna de ellas pueden ser sintetizada completamente, o por lo menos con la velocidad adecuada, en los tejidos de los animales y del hombre. Cumplen funciones de dos tipos, mantenimiento de las estructuras normales y de las funciones metabólicas normales. Por ejemplo, la vitamina A es esencial para el mantenimiento del tejido epitelial normal, la vitamina D actúa en la absorción de las sales necesarias para la formación y crecimiento del tejido óseo.

Ciertas vitaminas del grupo hidrosoluble, entre ellas la tiamina, riboflavina, ácido pantoténico y niacina son constituyentes esenciales de las enzimas respiratorias que son necesarias para la utilización de energía a partir del catabolismo oxidativo de azúcares y gases.

En el estudio de esta tesis es conveniente dividir estas sustancias nutri-

cionales en 2 grupos: los factores liposolubles y los hidrosolubles.

VITAMINAS LIPOSOLUBLES

Vitamina A.- La vitamina A (retinol), es importante para la función normal de las mucosas y la formación de rodopsina en las células de la retina. Aunque en las deficiencias netas, como en xeroftalmia y ceguera nocturna son frecuentes los síntomas de una difícil adaptación a la oscuridad. La recomendación para lactantes se basa en el contenido medio de retinol de la leche humana que es de aproximadamente 49 ug por 100 ml. Las cantidades recomendadas para lactantes hasta de seis meses de edad son de 420 equivalentes de retinol y de seis meses a un año de edad 400 equivalentes de retinol - - (2 000 UI). La leche de vaca, las fórmulas del comercio para lactantes, y - los alimentos para niños, suelen proporcionar una cantidad de vitamina A más que suficiente, aunque la leche humana y la de vaca puede tener un contenido muy variable de vitamina A según la dieta y las reservas maternas. Los suplementos, cuando se administran, deben vigilarse cuidadosamente, ya que en grandes dosis la vitamina A preformada es tóxica. Por lo tanto, los Comités de Drogas y de Nutrición de Pediatría recomiendan no dar suplementos mayores de 6 000 UI por dosis.

Vitamina D.- Se forma fácilmente en la piel por acción de la luz solar sobre el precursor, 7-dehidrocolesterol; sin embargo, la cantidad formada depende de varias variables, por ejemplo, grado de pigmentación cutánea, duración de la exposición a la luz solar, etc. Un aporte diario de vitamina D - de 2.5 mg (100 UI) evita el raquitismo y permite una absorción adecuada de - calcio, buen crecimiento y mineralización normal de los huesos en los lactantes. Sin embargo, se logra una absorción de calcio mejor cuando la inges- - tión es de tres a cinco veces mayor; por lo tanto, se aconseja el valor más alto (400UI). Como la leche humana solo proporciona 22 UI por litro, suele afirmarse que los lactantes que toman en pecho necesitan suplemento de vitamina D, aunque el punto está en discusión.

La leche evaporada, la leche completa fresca y las fórmulas preparadas del comercio, casi siempre se enriquecen con vitamina D (400 UI) por litro aprod

madamente, por lo tanto, no suele necesitar ningún suplemento para estos lactantes. En el caso de la vitamina D, como ocurre con la vitamina A, los ingresos excesivos (mayores de 2 000 UI al día) son peligrosos y deben evitarse.

Vitamina E.- La deficiencia de vitamina E en prematuros y lactantes de peso bajo se ha asociado con anemia hemolítica y edema, a consecuencia de pocas reservas de la vitamina.

En el recién nacido, las concentraciones plasmáticas de vitamina E son bajas (aproximadamente la tercera parte del valor del adulto) y en el lactante de peso bajo al nacer las concentraciones plasmáticas son más bajas todavía. Estos valores y los de lípido plasmáticos, en general, empiezan a aumentar pocos días después del nacimiento y al cabo de un mes alcanzan los valores normales para la infancia. El aumento de concentración plasmática de vitamina E es más rápido en lactantes alimentados al pecho que en los que toman leche de vaca, y el mayor contenido de vitamina E de la leche humana (2 a 5 UI por litro) cabe admitir que proporciona un ingreso adecuado para los lactantes. El contenido de tocoferol de las fórmulas del comercio no siempre es adecuado, pues debe tenerse en cuenta el tipo de grasa de la fórmula. Las fórmulas con grasa poliinsaturada necesitan más vitamina E que las dietas con grasa más saturada. La necesidad para lactantes hasta los seis meses es de 4 UI, de seis meses a un año de 5 UI.

Vitamina K.- La vitamina K es necesaria para la síntesis de protrombina y otros factores sanguíneos de coagulación, esta es sintetizada por las bacterias intestinales, y absorbida a nivel del intestino delgado, sin embargo, durante una semana aproximadamente después del nacimiento, y antes de establecerse la flora intestinal, se ha observado que las concentraciones de protrombina y de otros factores de coagulación son bajas en los lactantes, por lo tanto, se recomienda que los pequeños reciban entre 0.5 a 1 mg de vitamina K por vía intramuscular inmediatamente después del nacimiento, para evitar síntomas de deficiencia de vitamina K (por ejemplo, hemorragia).

VITAMINA HIDROSOLUBLE

Vitamina C.- La enfermedad por falta neta de vitamina C, es escorbuto, sin embargo, puede presentarse en lactantes que toman exclusivamente leche de vaca, ya pobre en vitamina termolábil, y que contiene menor todavía por someterse a calentamiento o ebullición; Aunque las necesidades de ácido ascórbico durante la infancia no las conocemos bien, se recomienda 40 a 55 mg., por litro, que hay en la leche de la madre bien alimentada.

La dosis recomendada es de 35 mg/día.

Tiamina, riboflavina y niacina.- Estas tres vitaminas funcionan en el cuerpo como partes integrantes del sistema enzimático importante.

Además la ingestión prolongada de dietas pobres en tiamina tiene por consecuencia en la infancia, beriberi, con insuficiencia cardíaca y signos neurológicos. Las dietas pobres en riboflavina producen síntomas característicos, incluyendo queilosis, estomatitis angular, cambios de la piel escrotal, dermatitis seborreica y vascularización de la córnea.

Las dietas pobres en niacina (y triptófano, que es precursor de niacina en el hombre), acaban originando pelagra, cuyos síntomas son, diarrea y demencia.

Las experiencias efectuadas en las cuales se basan las recomendaciones de tiamina para lactantes, son muy pocas. Sin embargo Knott y colaboradores en 1878, han sugerido, a base de estudios de la leche humana, que la necesidad diaria mínima es aproximadamente de 0.30 mg por kg. de peso corporal, lo cual corresponde aproximadamente a 0.27 mg por 1 000 kcal. La dosis recomendada es 0.3 mg para lactantes hasta los seis meses de edad y 0.5 de seis meses a un año. El contenido medio de riboflavina de la leche humana es de aproximadamente 40 mg por 100 ml. Se aconseja 0.4 mg para lactantes hasta los seis meses a un año de edad. La leche humana contiene aproximadamente 0.19 mg de niacina y 22 mg de triptófano por 100 ml. ó 70 kcal.

La cantidad de niacina en los lactantes hasta seis meses es de 5 mg por 1 000 kcal; (850 ml), de leche proporcionarían 1.4 de niacina y 187 mg de triptófano. Como se considera que 60 mg de triptófano equivalen a 1 mg de niacina, la leche humana proporciona al lactante aproximadamente 4.5 mg de -

equivalente de niacina.

Acido Fólico.- La deficiencia de ácido fólico provoca anemia megaloblástica y la necesidad diaria para lactantes es de aproximadamente 5 mg por kg. La leche humana o la de vaca proporciona 5 mg por 100 ml. o sea que asegura y cubre las necesidades del lactante. El requerimiento, para lactante de menor de un año de edad es de 50 mg. Un lactante que toma el pecho de una madre carente de ácido fólico por largo tiempo está en peligro de desarrollar deficiencia , anemia megaloblástica.

Los lactantes que toman leche de cabra, fuente pobre de ácido fólico, también se hallan en peligro de deficiencia.

Vitamina B₆.- Aunque no se ha afirmado que la vitamina B₆ (que incluye piridoxina, piridoxamina) plantea problema nutritivo en ninguna parte del mundo.

Se ha comprobado que los lactantes privados de vitamina B₆ presentan, síntomas diversos, incluyendo convulsiones y anemia. Los valores de vitaminas B₆ en la sangre del cordón son más altos que en la sangre materna; por lo tanto, la criatura nace con una reserva de vitamina B₆.

Durante los primeros días de la lactancia de leche humana contiene 0.01 a - 0.02 mg por litro; más tarde aumenta aproximadamente 0.1 mg por litro. Aunque la leche de vaca tiene un contenido de vitamina B₆ más alto (0.23 a 0.6 mg por litro), tiene asimismo un contenido más elevado de proteínas; cuanto mayor el tiempo de proteína, mayor la necesidad de B₆.

La junta de Alimentos y Nutrición de Estados Unidos de Norteamérica sugiere un valor de 0.015 mg de vitamina B₆ por g de proteína ó 0.04 mg. por kcal., señala 0.3 mg para lactantes de 0 a seis meses, y 0.4 mg. para lactantes de seis meses a un año.

Vitamina B₁₂.- Es esencial para la función normal de las células sanguíneas su deficiencia puede causar anemia, degeneración de la médula espinal y dificultades en el tubo digestivo. No se han observado síntomas de deficiencia de vitamina B₁₂.

Por lo tanto, la recomendación para lactantes se ha establecido al nivel -

que corresponde a la leche de la madre (0.3 mg por día) hasta un año de edad, las personas que toman dieta vegetariana están en peligro de deficiencia de vitamina B₁₂.

Acido pantoténico.- Es un componente de la coenzima "A" que interviene el metabolismo intermediario de los nutrientes principales; está tan distribuido en los alimentos que en el hombre no se conocen señales de deficiencia dietética. La leche humana contiene aproximadamente 2 mg, por litro, y la de vaca unos 3.5 mg por litro, o sea más que lo suficiente para evitar deficiencias en lactantes, que son muy raras.

La determinación cuantitativa de la necesidad de otras vitaminas hidrosolubles todavía no se ha establecido. Como no se han señalado deficiencias de este nutriente en lactantes, parece que sus necesidades quedarían cubiertas con las diversas fuentes de leche y fórmulas con las cuales se alimentan.

(1,6,7,9,13,17,19,24,30).

SODIO

El sodio constituye más de 90 por 100% de los cationes de los líquidos extracelulares; por lo tanto, con sus aniones acompañantes, el sodio rige la presión osmótica de los líquidos extracelulares.

Por su acción sobre la osmolaridad, el contenido sódico de la economía rige el volumen del comportamiento líquido extracelular. Como tiene que haber equilibrio osmótico entre los comportamientos celular y extracelular las transferencias netas de agua resultan de variaciones en la concentración de sodio en el líquido extracelular.

En esta forma, el contenido líquido en los diversos comportamientos está condicionado por la concentración de sodio en uno de ellos.

En el mantenimiento del equilibrio acido-base, el papel del sodio, como el principal catión fijo, es tan importante como el papel predominante desempeñado por este ión en el control de la osmolaridad del volumen de líquido.

Un estudio del contenido químico de la sangre indica que la concentración de sodio rige la cantidad de "base disponible".

El metabolismo y el equilibrio del sodio están estrechamente relacionados con su papel de conservación de un pH adecuado en los líquidos corporales.

La presencia del ión sodio es necesario para asegurar potenciales de membranas normales. Los múltiples fenómenos de la economía que depende de fenómenos eléctricos requieren Sodio (Na), en balance adecuado con otros iones, en particular Potasio (K). Riger demostró claramente la necesidad de Sodio (Na), para mantener adecuadamente el latido cardíaco, y una buena función neuromuscular también requiere Na, según lo demuestra la debilidad y la hiponatremia.

POTASIO

El ión Potasio tiene diversas funciones en la economía. Es el catión más importante que hay en los líquidos intracelulares. Todas las actividades celulares que incluyen fenómenos eléctricos, como las contracciones cardíacas y de músculo esquelético, y la conducción del impulso nervioso, dependen de gradientes de potasio y sodio a uno y otro lados de la membrana celular.

Estas y muchas funciones hace que la concentración de Potasio tenga importancia fundamental.

Contenido de Potasio en el Organismo.

El cuerpo contiene en total, una cantidad de potasio que se ha calculado en 3 000 a 4 000 meq, o sea 40 a 60 meq/kg de peso corporal.

Las grandes variaciones dependen de diferencias en las técnicas de valoración y en la variabilidad de proporción entre masa corporal magra y tejido adiposo en un hombre normal. Las técnicas corrientes de análisis químico de los tejidos, probablemente den valores más altos que las técnicas, utilizando dilución del isótopo ^{42}K , que tienen importantes limitaciones para valorar el contenido potásico de la economía. Esta técnica de dilución de radioisótopo no logra establecer equilibrio con todo el potasio de la economía. El potasio queda distribuido en varias unidades funcionalmente separadas en compartimientos, que establecen recambios con el plasma de intensidades diversas. Por tal motivo las cantidades trazadas, inyectadas, no entran en equilibrio con el potasio que se desea medir. Sin embargo, empleando contadores para todo el cuerpo actualmente resulta posible determinar el contenido potásico de la economía. El valor que se obtiene corresponde al contenido del radioisótopo natural de potasio ^{40}K . El hombre a pasado toda su vida estableciendo equilibrio con este isótopo. Así se han logrado datos más seguros sobre metabolismo del potasio en estado normal y patológico.

CALCIO

Las funciones del ión calcio incluyen su influencia sobre permeabilidad de las membranas celulares, excitabilidad neuromuscular, transmisión de impulsos nerviosos, coagulación de la sangre y su papel en la activación de diversos sistemas enzimáticos. Estas actividades del calcio dependen de su grado de ionización, que a su vez está influido por cambios del equilibrio ácido-base.

La alcalemia disminuye la cantidad de calcio que hay en forma ionizada, sin modificar necesariamente la cantidad total en el plasma. El efecto de la alcalemia se identifica por la aparición de tetania en el síndrome de hiper

tilación, en el cual el calcio sérico total es normal, pero la fracción ionizada es muy pequeña.

La ionización del calcio aumenta cuando hay acidemia. En la uremia con calcemia anormalmente baja, la forma ionizada constituye un porcentaje elevado del calcio total presente con lo cual asegura una concentración de iones de calcio suficiente para evitar la tetania.

Si el pH de la sangre se desplaza nuevamente hasta valores normales, la ionización del calcio disminuye y puede producir tetania. Las necesidades metabólicas diarias de calcio, sus vías de eliminación y sus funciones en el metabolismo óseo van ligadas al requerimiento del sistema.

Estudios de balance han revelado que las mujeres lactantes deben recibir - aproximadamente 1 a 1.5 gramos de calcio diariamente, para poder excretar en su leche 300 a 500 miligramos por día.

La ingesta diaria de calcio y fósforo no correlaciona con sus concentraciones en la leche, lo que puede significar que estos minerales, implicados en el metabolismo óseo principalmente, deben ser tomados en la reserva materna o que la ingestión materna tiene un tope de asimilación, pasado el cual no excreta el excedente. Aunque la cantidad total consumida por día, parece ser más, que la proporción de estos elementos.

En la leche materna la proporción calcio y fósforo es de 2.43 y 1 mg/100, - similar a la que se encuentra en el plasma sanguíneo del adulto y del niño. La interacción metabólica en cuanto a absorción, ionización, transporte, fijación, etc., hace que raramente se presenten casos de hipocalcemia-hiperfosfatemia en el período neonatal, en niños amamantados con leche humana, en - contraste con lo observado en niños alimentados con fórmula lácteas o leche de vaca. En aproximadamente la mitad de los casos de tetania hiperfosfatemia, se encuentra también una deficiencia asociada de magnesio.

La leche humana contiene cantidades relativamente pequeñas de sodio, cloro y potasio en comparación con la de los mamíferos. Estas concentraciones menores están relacionadas con valores tisulares y curculantes también menores, y contribuyen con una carga renal de solutos, que en condiciones normales de riñón de recién nacido y del lactante menor no tiene dificultad de manejar.

(3,6,9,14,17,21,22,30).

MATERIAL HUMANO

Para la obtención de la leche materna humana, se realizó una selección de - entre 60 madres, obteniéndose de ésta 24 las cuales cumplían un tiempo de 1 a 28 días post-parto, así mismo estas 24 madres tenían a su hijo respectivamente internado en el Hospital Infantil Moctezuma por algún tipo de patología padecida por el mismo.

RECURSOS

"MATERIAL Y EQUIPO"

- .Area esteril
- .Asa de sembrado
- .Aguja inyectora
- .Batas quirúrgicas esteriles
- .Compresas esteriles
- .Cajas petri normal 10 x 25
- .Cajas petri para inmunodifusión radial
- .Cubrebocas
- .Caja de unisel
- .Frascos esmerilados de 7 ml.
- .Guantes quirúrgicos esteriles
- .Gorros esteriles
- .Gasas esteriles
- .Jeringas esteriles
- .Matraz aforado 50 ml.
- .Pinzas de argolla
- .Pipetas de 2ml
- .Pipetas de 10ml
- .Tubos 13 x 100
- .Tiraleches esteriles
- .Tela adhesiva
- .Vaso P.P. 10 ml
- .Centrifuga (marca Klitz)
- .Equipo para cuantificación de inmunoglobulinas
(Inmunodifusión radial) tipo sensible de 30 mcgr Hocht.
- .Estufa de incubación (marca klitz)
- .Equipo para tinción de papanicolau
- .Photometer modelo M. Leitz
- .Flomometro Corning 400
- .Liofilizadora (con bomba de vacio, Feliwelch con motor koblenz

de 2.49 μ x, 113cp y 1725 rpm, cámara de vacío y enfriamiento
virtas modelo 10-55).

•Microscopio convencional.

REACTIVOS

- .Agua destilada
- .Agua bidestilada
- .Alcohol isopropilico 25%
- .Agar gelosa sangre 40%
- .Acetona
- .Agua corriente
- .Acetato de butilo
- .Balsamo de canada
- .Cloruro de sodio .85%
- .Clorurato de sodio
- .Detergente exterox
- .Etanol 50%
- .Etanol 80%
- .Etanol 70%
- .Etanol al 95%
- .EDTA (ácido etilendiaminotetraacetico)
- .Hielo seco
- .Hematoxilina de Harris
- .Iodine (solución de Iodo)
- .Jabón quirúrgico
- .Leche humana
- .Metanol 95%
- .Metanol puro
- .Reactivo EA-36
- .Reactivo de Biuret
- .Reactivo OG-6
- .Sal valorado del Calcio
- .Solución valorada de Sodio y Potasio

M E T O D O S

Los métodos que fueron elegidos para realizar las determinaciones del producto biológico son los siguientes:

Los procedimientos para cada una de las determinaciones así como sus fundamentos se describen a continuación.

| DETERMINACIONES | METODOS |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Asepsia y Antisepsia | Manual con pinzas quirúrgicas. |
| Obtención del producto biológico | Succión con tiraleches |
| Proteínas Totales | Biuret |
| Sodio | Flamometría |
| Potasio | Flamometría |
| Calcio | Ferro - Ham |
| Inmunoglobulina G | Inmunodifusión-Radial |
| Inmunoglobulina M | Inmunodifusión-Radial |
| Inmunoglobulina A | Inmunodifusión-Radial |
| Exámen Microscópico | Tinción de Papanicolau |

OBTENCION DEL PRODUCTO BIOLÓGICO

ASEPSIA Y ANTISEPSIA

- 1.- Lavado quirúrgico de manos;
- 2.- Lavar las glándulas mamarias con agua y jabón;
- 3.- Secar;
- 4.- Con una gasa prensada a unas pinzas quirúrgicas, colocar 5 ml de Iodine;
- 5.- Lavar la zona con esta solución en sentido rotatorio extrínseco;
- 6.- Dejar secar al aire;
- 7.- Colocación de guantes estériles a la donadora para masaje a las glándulas mamarias;
- 8.- Recolección de leche humana, por medio de un tiraleche y dándose masaje la misma donadora haciendo que la salida de la leche sea espontánea y recolectándola en frascos ampula de 7 ml.

METODO DE LIOFILIZACION

FUNDAMENTO.

Este método está basado en la obtención de un medio ambiente herméticamente cerrado, enfriable en donde una solución acuosa llega hasta su punto de congelación, por medio de vacío, existiendo un arrastre del producto.

El hielo se transforma en vapor de agua, sublimándose y quedando el material no volátil distribuido en el espacio correspondiente al volumen inicial, - siendo esta una superficie sólida y muy frágil, que es redisoluble en agua.

PROCEDIMIENTO

- A un frasco ampula de 7 ml. agregar 5 ml. de leche humana.
- Realizar una dilución 1 : 4 de alcohol - acetona, más 1 kg. de hielo seco, y agregar todo al recipiente de frío de la liofilizadora.
- Congelar la muestra en los frascos introduciéndolos en la solución anterior hasta que el producto éste completamente sólido y cuarteado.
Esto se logra rápidamente si la muestra se hace girar vigorosamente dentro de la solución.
- Colocar los frascos en las entradas de la liofilizadora, una vez que el - contenido este completamente congelado.
- Abrir la llave de vacío, así como prender la bomba de la liofilizadora.
- El liofilizado quedará listo cuando el frasco ampula no presenta proporciones de escarcha de hielo en el exterior y esté a una temperatura entre 20 - 40°C.

DETERMINACION DE ELECTROLITOS
SODIO (Na) Y POTASIO (K) POR EL
METODO DE FLAMOMETRIA

FUNDAMENTO

El suero diluido es pulverizado en una flama cuya temperatura es suficiente para excitar los electrones de algunos elementos, Sodio y Potasio en este caso, a un nivel de energía superior y al regresar a su estado original emite una radiación de longitud de onda característica para cada elemento, la intensidad de esta radiación es proporcional a la concentración del elemento.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Prender el flamómetro "Carnig 400" 5 minutos antes de la determinación.
- 2.- En un matraz alforado de 50 ml. colocar 1 ml. de leche humana más 1 ml. de jabón exterox y aforar con agua destilada evitando la espuma.
- 3.- Agitar vigorosamente el matraz hasta formar espuma.
- 4.- En un matraz o vaso de pp. de 10 ml. colocar standard de calibración de Na y K, el cual contiene 140 meq/ml de Sodio (Na) y 5 meq/ml. de Potasio (K).
- 5.- Calibrar el aparato, respectivamente con cada uno de los filtros de Sodio (Na) y Potasio (K), esto es previo a la determinación, para valorar los filtros.
- 6.- En un matraz o vaso de pp 10 ml. colocar las muestras problemas y posteriormente introducir en estas el atomizador del flamómetro, variando la atomización con blanco y standard un mínimo de 3 veces.
- 7.- Leer los resultados directos de la escala del aparato.

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES
POR EL METODO DE BIURET

FUNDAMENTO

El reactivo de Biuret en solución alcalina produce una coloración rojo violeta en presencia de sulfato cuprico, cuando reacciona con los enlaces peptídicos de las proteínas.

El Color es proporcional a la cantidad de proteínas presentes.

PROCEDIMIENTO

- En dos tubos de ensayo previamente marcados con blanco y problema, agregar una alícuota de 0.1 de leche al problema.
- Agregar 2.0ml., de cloruro de sodio al 85%, a cada uno de los tubos.
- Agregar a todos los tubos 4 ml., de reactivo de Biuret.
- Dejar reposar a temperatura ambiente por 20 minutos.
- Leer en espectrofotometro "Coleman" a una densidad óptica de 535 nm
- El resultado se obtiene multiplicando la densidad óptica del problema por el factor del reactivo usado. En este caso el valor del factor fué de - 18.6., dando la concentración de proteínas totales en mg/dl.

DETERMINACION DE CALCIO POR
EL METODO DE FERRO - HAM.

FUNDAMENTO

El ácido clorántrico precipita al calcio, como cloranilato cálcico, el cual se disuelve con solución de E.D.T.A., y forma el cloranilato sódico soluble de color rosa.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Problema, pipetear 5 ml. de leche humana total en el fondo de un tubo de centrífuga de 13x100.
- 2.- Control, en un segundo tubo, pipetear 5 ml., de sal valorada de calcio (1 ml. = .1 mg de CALCIO).
- 3.- Añadir a todos los tubos .25 ml. de cloranilato de sodio agitando constantemente por rotación para disolver cualquier precipitado de proteína que se puede formar.
- 4.- Dejar reposar los tubos 30 minutos.
- 5.- Centrifugar a 1800 rpa durante 10 minutos; decantar el sobrenadante sobre una gasa o papel filtro.
- 6.- Secar la boca del tubo con gasa, lavar el precipitado con 4 ó 5 ml. de alcohol isopropílico al 25% usando un chorro fino, desbaratando el precipitado.
- 7.- Centrifugar y decantar las muestras de igual manera como en el paso No. 5
- 8.- Añadir .05 ml., de agua destilada a cada una de las muestras.
- 9.- Agitar hasta deshacer el precipitado de cada uno de las muestras.
- 10.- Añadir 1.1 ml., de EDTA al 5% a todos los tubos.
- 11.- Agitar por inversión los tubos hasta la disolución total, evitando la formación de la espuma.

- 12.- Leer el problema y el control de un photometer modelo N. 520 mv., a 620 nm., ajustando a 100% de densidad óptica, con un blanco de reactivo.
- 13.- Anotar los resultados del control y del problema y realizar el cálculo correspondiente.

CALCULO**DENSIDAD OPTICA DEL PROBLEMA****DENSIDAD OPTICA DEL CONTROL****X 10=MG % DEL CALCIO**

INMUNODIFUSION RADIAL

FUNDAMENTO

Se basa en las reacciones de precipitación del tipo de difusión simple que se produce cuando se incorpora uno de los componentes, por lo común el anticuerpo, dentro de un gel de agar, mientras el otro componente, el antígeno, se introduce en un orificio dentro del gel. La difusión ocurre en forma radial comenzando desde el orificio. La Inmunodifusión radial simple permite cuantificar diversos anticuerpos.

Así para averiguar que cantidad de Inmunoglobulina G, M o A, por ejemplo, - que existen en un suero, bastará depositar una cantidad determinada de dicho suero en orificio practicados en placas de agar que contengan antiglobulinas G, M o A en ése orden. De acuerdo con los principios de la difusión, el diámetro del halo de precipitación está en relación directa con la concentración antigénica.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Colocar en cada uno de los pozos de la caja preparada, 5 microlitos de - leche total, ayudados por la aguja "dispenser".
- 2.- Incubar las cajas de gel durante 24 horas a 37° C ó no menos de 26° C.
- 3.- Leer el halo de reacción Ag - Ac con una regla micrométrica.
- 4.- Incubar nuevamente a 27° C por otras 24 horas, la caja de gel.
- 5.- Checar halo de reacción Ag - Ac, con la regla micrométrica realizar la - medida de reacción.

METODO DE COLORACION DE PAPANICOLAU

FUNDAMENTO

Consta de un colorante nuclear el cual es la hematoxilina de Harris, que actúa en medio acuoso por lo que requiere la hidratación previa de los preparados en alcoholes de concentración decreciente, seguido de la coloración citoplasmática (EA 36 y OG-6) que es precipitada por una deshidratación en alcoholes de concentración creciente, los últimos pasos son de lavado y clarificación.

La hematoxilina de Harris, colorante nuclear, colorea los núcleos picnóticos de color violeta oscuro y quedan opacos a la luz, y los núcleos vesiculosos de azul-violáceo.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Realizar los frotis de leche humana, por corrimiento sobre un porta objetos.
- 2.- Dejar secar al aire libre para que se fije la muestra.
- 3.- Agregar a los frotis etanol al 80%, dejarlos 2 minutos y desecharlo, - hacer la misma operación con etanol al 70% y al 50%.
- 4.- Poner agua destilada a los frotis por un tiempo de 2 minutos.
- 5.- Incorporar Hematoxilina de Harris por 45 segundos.
- 6.- Lavar con agua corriente durante 10 minutos.
- 7.- Poner etanol al 50% a todos los frotis durante 2 minutos, realizando el mismo proceso como en el paso número 3 pero con etanol 70%, 80% y 96% en ese orden.
- 8.- Agregar a los frotis reactivo OG - 6 durante 2 minutos.
- 9.- Poner etanol al 98% por un espacio de 4 minutos.
- 10.- Agregar reactivo EA - 36 por 6 minutos.
- 11.- Vertir etanol del 96% durante 6 minutos.
- 12.- Incorporar a las preparaciones acetato de Butilo durante 2 minutos, este paso se repite 2 veces.

13.- Posterior a las preparaciones se montan con balsemo de Canada para su lectura.

14.- Realizar la observación a microscopio.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas correspondientes de cada una de las determinaciones a diferentes intervalos de tiempo, tomando como - cía cero, antes de realizar la liofilización del producto biológico y a 1, 15, 30, 45, 60 y 90 días después de la liofilización.

Para realizar las gráficas, se obtuvo una media aritmética de cada una de - las determinaciones en cada intervalo de tiempo, y así observar el comporta- miento global de cada parámetro utilizado.

Estas gráficas se muestran en la parte inferior de cada una de las tablas - de resultados.

TABLA # 1. Determinación de Proteínas Totales por el método de Biuret, antes y después de liofilizar.
(Unidades de Proteínas Totales en mg/dl).

| Casos | 0 Dias | 90 Dias |
|-------|--------|---------|
| 1 | 3.0 | 2.0 |
| 2 | 7.0 | 6.2 |
| 3 | 9.0 | 3.1 |
| 4 | 2.0 | -- |
| 5 | 0.2 | -- |
| 6 | 1.4 | 1.0 |
| 7 | 1.7 | 2.3 |
| 8 | 4.0 | 4.0 |
| 9 | 3.9 | 3.4 |
| 10 | 4.0 | 3.0 |
| 11 | 5.0 | 6.0 |
| 12 | 1.2 | 1.0 |
| 13 | 3.2 | 2.0 |
| 14 | 3.2 | 3.3 |
| 15 | 6.8 | 5.4 |
| 16 | 7.4 | 6.0 |
| 17 | 7.9 | 7.5 |
| 18 | 8.3 | 8.0 |
| 19 | 9.4 | 9.3 |
| 20 | 5.6 | 4.7 |
| 21 | 3.3 | 2.7 |
| 22 | 4.1 | 2.7 |
| 23 | 1.6 | -- |
| 24 | 2.9 | 3.5 |
| X | 4.42 | 3.63 |

0 Dias - Recién emisión de la muestra antes de liofilizar

90 Dias - Después de liofilizar

-- No detectada

X Media calculada en cada intervalo de tiempo.

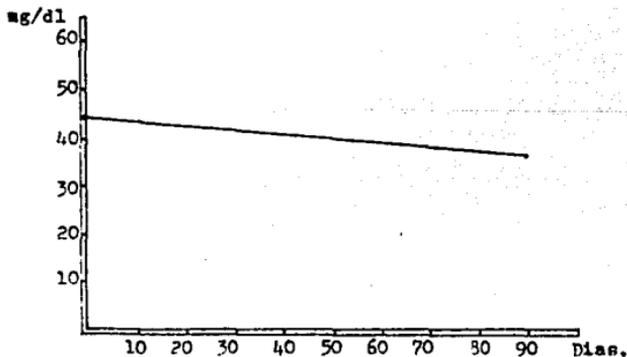


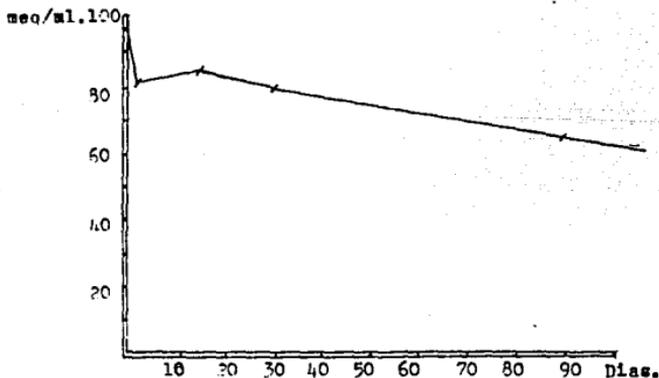
TABLA = 2. Determinación de Potasio (K) por el método de Flanometría antes y después de liofilizar (Unidad de Potasio (K) en meq/ml).

| Casos | 0 Días | 1 Día | 15 Días | 30 Días | 60 Días | 90 Días |
|-------|--------|-------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 12.9 | 10.5 | 10.0 | 7.3 | 6.0 | 6.0 |
| 2 | 10.1 | 7.3 | 6.6 | 6.4 | 5.3 | 4.0 |
| 3 | 9.3 | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 5.9 | 6.3 |
| 4 | 4.7 | 4.1 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| 5 | 7.2 | 5.6 | 5.0 | 3.9 | 4.1 | 2.0 |
| 6 | 6.3 | 6.3 | 6.1 | 5.2 | 4.7 | 3.8 |
| 7 | 13.0 | 8.5 | 8.3 | 8.1 | 5.1 | 4.2 |
| 8 | 9.2 | 7.2 | 6.3 | 6.1 | 4.2 | 3.8 |
| 9 | 11.3 | 10.0 | 9.3 | 9.7 | 6.9 | 7.4 |
| 10 | 14.0 | 12.6 | 12.0 | 13.0 | 7.2 | 6.9 |
| 11 | 7.7 | 5.3 | 4.8 | 1.2 | 14.0 | 8.3 |
| 12 | 13.1 | 12.4 | 11.7 | 7.6 | 13.3 | 9.2 |
| 13 | 10.7 | 9.6 | 13.1 | 14.7 | 8.1 | 9.0 |
| 14 | 9.2 | 8.3 | 8.7 | 9.0 | 7.5 | 6.4 |
| 15 | 66.3 | 5.1 | 6.3 | 7.1 | 6.2 | 5.9 |
| 16 | 7.5 | 7.0 | 66.1 | 7.5 | 7.3 | 7.1 |
| 17 | 10.2 | 9.7 | 10.4 | 10.0 | 10.0 | 9.6 |
| 18 | 9.6 | 9.6 | 7.2 | 9.5 | 9.4 | 6.2 |
| 19 | 8.4 | 8.1 | 8.6 | 8.4 | 7.6 | 5.0 |
| 20 | 9.8 | 9.9 | 11.1 | 9.0 | 11.0 | 10.7 |
| 21 | 13.9 | 13.0 | 13.2 | 13.3 | 6.5 | 9.9 |
| 22 | 12.1 | 12.0 | 14.0 | 11.7 | 12.1 | 11.0 |
| 23 | 6.9 | 5.2 | 6.7 | 6.0 | 5.3 | 6.1 |
| 24 | 7.2 | 6.7 | 8.1 | 7.0 | 5.3 | 7.8 |
| X | 9.6 | 8.3 | 8.5 | 8.0 | 7.37 | 6.6 |

0 Días - Recién emisión de la muestra antes de liofilizar

1, 15, 30 60 y 90 Días después de liofilizar

X Media calculada en cada intervalo de tiempo.



TA IA # 3. Determinación de Sodio (Na) por el método de Flamometría antes y después d liofilizar. (UI de Sodio (Na) en meq/ml).

| Casos | 0 Días | 15 Días | 30 Días | 45 Días | 60 Días | 90 Días |
|-----------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 116.5 | 12.5 | 12.0 | 11.3 | 13.0 | 11.0 |
| 2 | 17.0 | 17.0 | 16.0 | 17.0 | 6.0 | 5.4 |
| 3 | 26.0 | 26.0 | 22.0 | 20.0 | 9.0 | 4.2 |
| 4 | 32.0 | 15.0 | 10.0 | 3.0 | - - | - - |
| 5 | 30.0 | 29.0 | 30.0 | 30.0 | 23.0 | 6.0 |
| 6 | 15.0 | 13.0 | 12.0 | 6.0 | 6.0 | 3.0 |
| 7 | 28.0 | 11.0 | 11.0 | 10.0 | 7.0 | 7.0 |
| 8 | 13.0 | 12.0 | 10.0 | 10.0 | 6.0 | 6.3 |
| 9 | 9.0 | 13.0 | 7.0 | 13.0 | 10.0 | 10.0 |
| 10 | 16.0 | 16.0 | 15.0 | 15.0 | 14.0 | 9.0 |
| 11 | 14.0 | 14.0 | 10.0 | 9.0 | 7.0 | 11.0 |
| 12 | 26.0 | 30.0 | 21.0 | 13.0 | 6.0 | 2.0 |
| 13 | 10.0 | 9. | 9.0 | 7.0 | 9.0 | 5.0 |
| 14 | 24.0 | 18.0 | 16.0 | 15.0 | 11.0 | 9.0 |
| 15 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 16.0 | 13.0 | 15.0 |
| 16 | 12.5 | 12.0 | 9.0 | 7.0 | 11.0 | 13.0 |
| 17 | 16.0 | 15.0 | 13.0 | 9.0 | - - | - - |
| 18 | 17.0 | 15.0 | 14.0 | 14.0 | 17.0 | - - |
| 19 | 22.0 | 10.0 | 19.0 | 13.0 | 18.0 | 21.0 |
| 20 | 19.0 | 14.0 | 16.0 | 14.0 | 19.0 | 1.0 |
| 21 | 17.0 | 15.0 | 13.0 | 11.0 | 12.0 | 1.9 |
| 22 | 20.0 | 16.0 | 18.0 | 11.0 | 9.5 | 6.0 |
| 23 | 6.0 | 4.0 | 4.0 | 5.0 | 2.0 | 3.0 |
| 24 | 19.0 | 19.0 | 17.0 | 19.0 | 2.0 | 5.0 |
| \bar{X} | 18.5 | 15.6 | 14.3 | 12.3 | 9.6 | 6.4 |

0 Días - Recién emisión de la muestra antes de liofilizar

1, 15, 30, 60 y 90 Días después de liofilizar

- - No detectada

X Media calculada en cada intervalo de tiempo.

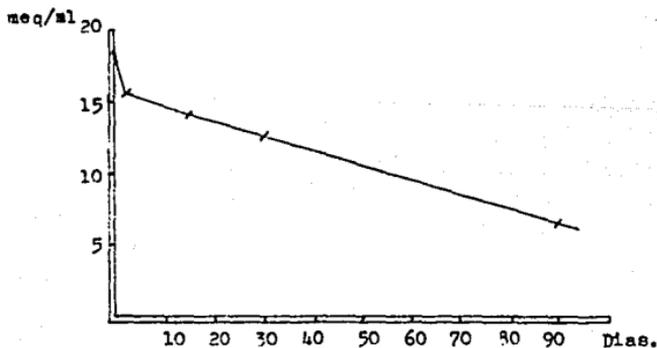


TABLA # 4 Determinación de Calcio (Ca) por el método de Ferro-Ham antes y después de liofilizar. (Unidades de Calcio (Ca) en mg/100).

| Casos | 0 Días | 1 Día | 15 Días | 30 Días | 60 Días | 90 Días |
|-----------|--------|-------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 4.6 | 6.1 | 3.3 | 5.0 | 3.0 | 5.0 |
| 2 | 5.2 | 3.3 | 3.9 | 5.2 | 3.9 | 5.0 |
| 3 | 5.3 | 8.7 | 6.6 | 6.0 | 6.0 | 6.4 |
| 4 | 3.7 | 9.0 | 3.9 | 4.0 | 3.0 | 4.0 |
| 5 | 5.2 | 7.5 | 4.9 | 5.0 | 4.0 | 5.0 |
| 6 | 3.4 | 4.1 | 3.0 | 3.5 | 3.0 | 3.0 |
| 7 | 6.1 | 6.2 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| 8 | 3.2 | 3.2 | 3.4 | 3.0 | 3.4 | 3.0 |
| 9 | 3.7 | 3.9 | 3.6 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| 10 | 9.2 | 8.0 | 9.0 | 8.5 | 9.0 | 8.0 |
| 11 | 4.5 | 4.0 | 4.0 | 3.5 | 4.0 | 3.0 |
| 12 | 5.6 | 5.1 | 5.0 | 5.5 | 5.0 | 5.0 |
| 13 | 6.3 | 6.0 | 6.0 | 5.0 | 5.0 | 6.0 |
| 14 | 5.1 | 5.1 | 5.0 | 5.5 | 2.5 | 5.0 |
| 15 | 5.0 | 4.6 | 5.0 | 5.5 | 3.0 | 5.0 |
| 16 | 4.9 | 5.0 | 4.5 | 4.0 | 1.0 | 4.0 |
| 17 | 3.7 | 3.6 | 3.5 | 4.0 | 2.0 | 4.0 |
| 18 | 4.1 | 4.1 | 4.0 | 3.5 | 4.0 | 3.0 |
| 19 | 6.3 | 5.7 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| 20 | 3.7 | 3.0 | 3.7 | 3.5 | 3.0 | 3.0 |
| 21 | 8.0 | 6.4 | 8.0 | 8.0 | 9.0 | 8.0 |
| 22 | 5.4 | 5.4 | 5.0 | 5.4 | 5.0 | 5.0 |
| 23 | 2.0 | 1.0 | 4.0 | 1.5 | 1.0 | 1.0 |
| 24 | 4.7 | 4.0 | 4.5 | 4.0 | 5.0 | 5.0 |
| \bar{X} | 4.95 | 5.1 | 4.8 | 4.7 | 4.1 | 4.1 |

0 Días - Recien emisión de la muestra antes de liofilizar
 1, 15, 30, 60 y 90 Días después de liofilizar
 \bar{X} Media calculada en cada intervalo de tiempo

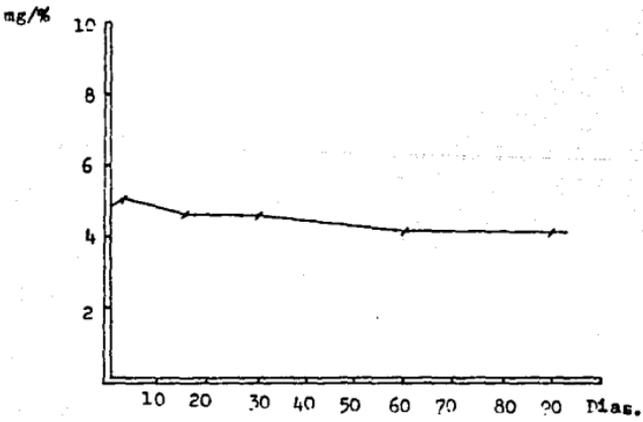


TABLA # 5. Determinación de Inmunoglobulina "G" (I gG) por el método de Inmunodifusión - Radial, antes y después de liofilizar. (Unidad de Inmunoglobulina en UI/ml).

| Casos | 0 Dias | 1 Día | 15 Dias | 30 Dias | 60 Dias | 90 Dias |
|-----------|--------|-------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 50 | 42 | 39 | 37 | 35 | 27 |
| 2 | 26 | 16 | - | - | - | - |
| 3 | 29 | 13 | - | - | - | - |
| 4 | 75 | 53 | 40 | - | - | 16 |
| 5 | 66 | 60 | - | 26 | - | - |
| 6 | 37 | 22 | 16 | - | - | - |
| 7 | 99 | 31 | - | - | - | - |
| 8 | 36 | 22 | - | - | - | - |
| 9 | 32 | 26 | 19 | 6 | 14 | - |
| 10 | 52 | 49 | - | - | - | - |
| 11 | 41 | 21 | - | - | - | - |
| 12 | 80 | 67 | 36 | - | - | - |
| 13 | 19 | 15 | - | - | - | - |
| 14 | 43 | 36 | - | - | - | - |
| 15 | 43 | 23 | - | - | - | - |
| 16 | 36 | 30 | 21 | - | - | - |
| 17 | 47 | 46 | - | 25 | - | 9 |
| 18 | 52 | 61 | 44 | - | - | - |
| 19 | 71 | 52 | - | - | - | - |
| 20 | 36 | 36 | - | - | 20 | - |
| 21 | 71 | 50 | 37 | - | - | - |
| 22 | 59 | 42 | - | - | - | - |
| 23 | 31 | 17 | - | 13 | - | - |
| 24 | 17 | 11 | - | - | - | - |
| \bar{X} | 48 | 35 | 10 | 5.0 | 2.8 | 2.4 |

0 Dias - Recien emisión de la muestra antes de liofilizar

1, 15, 30, 60 y 90 Dias después de liofilizar

- Detectada

X Media calculada en cada intervalo de tiempo.



TABLA # 6 Determinación de Inmunoglobulina "M" (IgM) por el método de
 Inmunodifusión - Radial, antes y después de liofilizar.
 (Unidades de Inmunoglobulina en UI/ml).

| Casos | 0 Días | 1 Día | 15 Días | 30 Días | 60 Días | 90 Días |
|-----------|--------|-------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 42 | 40 | 36 | 27 | 15 | 10 |
| 2 | 76 | 70 | 55 | 49 | 39 | 23 |
| 3 | 65 | 60 | 51 | 37 | 30 | 29 |
| 4 | 93 | 72 | 66 | 62 | 54 | 34 |
| 5 | 60 | 57 | 49 | 43 | 26 | 19 |
| 6 | 103 | 38 | 33 | 30 | 16 | 12 |
| 7 | 84 | 66 | 54 | 42 | 40 | 36 |
| 8 | 42 | 37 | 36 | 32 | 15 | - |
| 9 | 75 | 89 | 60 | 53 | 26 | 20 |
| 10 | 36 | 33 | 30 | 26 | 20 | 17 |
| 11 | 50 | 47 | 30 | 26 | 13 | 14 |
| 12 | 53 | 41 | 41 | 27 | - | - |
| 13 | 66 | 54 | 36 | 26 | 17 | 19 |
| 14 | 74 | 72 | 57 | 46 | 20 | 14 |
| 15 | 43 | 23 | 11 | 14 | 9 | 4 |
| 16 | 51 | 48 | 41 | 39 | 22 | - |
| 17 | 102 | 98 | 89 | 74 | 62 | 49 |
| 18 | 53 | 40 | 33 | 17 | 11 | - |
| 19 | 93 | 89 | 79 | 68 | 39 | 22 |
| 20 | 88 | 74 | 56 | 50 | 11 | 11 |
| 21 | 97 | 82 | 77 | 54 | 20 | 12 |
| 22 | 29 | 16 | 14 | 12 | 6 | - |
| 23 | 42 | 37 | 26 | 15 | 9 | - |
| 24 | 76 | - | - | - | - | - |
| \bar{X} | 66 | 53 | 44 | 36 | 21 | 14 |

0 Días - Recien emisión de la muestra antes de liofilizar

1, 15, 30, 60 y 90 Días después de liofilizar

- No detectada

\bar{X} Media calculada en cada intervalo de tiempo.

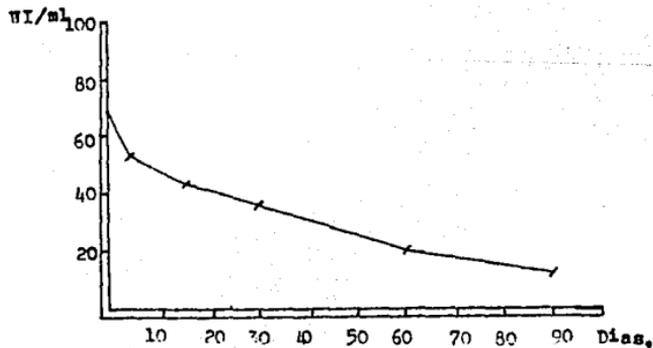


TABLA # 6 Determinación de Inmunoglobulina "M" (IgM) por el método de Inmunodifusión - Radial, antes y después de liofilizar. (Unidades de Inmunoglobulina en UI/ml).

| Casos | 0 Dias | 1 Día | 15 Dias | 30 Dias | 60 Dias | 90 Dias |
|-----------|--------|-------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 42 | 40 | 36 | 27 | 15 | 10 |
| 2 | 76 | 70 | 55 | 49 | 39 | 23 |
| 3 | 65 | 60 | 51 | 37 | 30 | 29 |
| 4 | 93 | 72 | 66 | 62 | 54 | 34 |
| 5 | 60 | 57 | 49 | 43 | 26 | 19 |
| 6 | 103 | 38 | 33 | 30 | 16 | 12 |
| 7 | 84 | 66 | 54 | 42 | 40 | 36 |
| 8 | 42 | 37 | 36 | 32 | 15 | - |
| 9 | 75 | 89 | 60 | 53 | 26 | 20. |
| 10 | 36 | 33 | 30 | 26 | 20 | 17 |
| 11 | 50 | 47 | 30 | 26 | 13 | 14 |
| 12 | 53 | 41 | 41 | 27 | - | - |
| 13 | 66 | 54 | 36 | 26 | 17 | 19 |
| 14 | 74 | 72 | 57 | 46 | 20 | 14 |
| 15 | 43 | 23 | 11 | 14 | 9 | 4 |
| 16 | 51 | 48 | 41 | 39 | 22 | - |
| 17 | 102 | 98 | 89 | 74 | 62 | 49 |
| 18 | 53 | 40 | 33 | 17 | 11 | - |
| 19 | 93 | 89 | 79 | 68 | 39 | 22 |
| 20 | 88 | 74 | 56 | 50 | 11 | 11 |
| 21 | 97 | 82 | 77 | 54 | 20 | 12 |
| 22 | 29 | 16 | 14 | 12 | 6 | - |
| 23 | 42 | 37 | 26 | 15 | 9 | - |
| 24 | 76 | - | - | - | - | - |
| \bar{X} | 66 | 53 | 44 | 36 | 21 | 14 |

0 Dias - Recien emisión de la muestra antes de liofilizar

1, 15, 30, 60 y 90 Dias después de liofilizar

- No detectada

\bar{X} Media calculada en cada intervalo de tiempo.

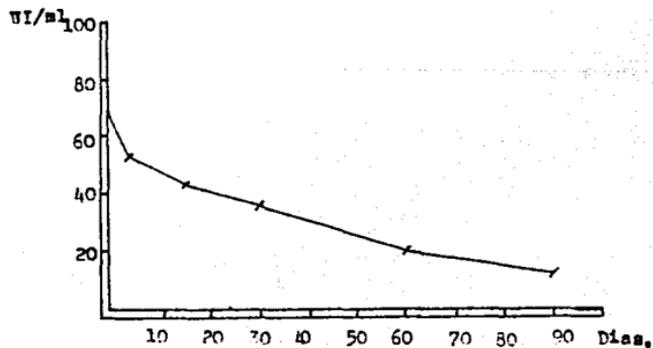


TABLA # 7. Determinación de Inmunoglobulina "A" (IgA) por el método de Inmunodifusión - Radial, antes y después de liofilizar. (Unidades de Inmunoglobulina en UI/ml.).

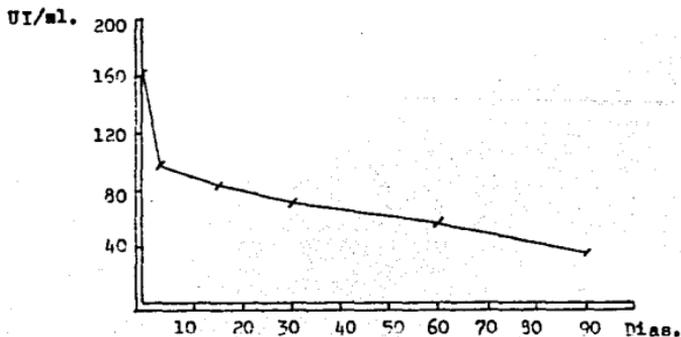
| Casos | 0 Días | 1 Día | 15 Días | 30 Días | 60 Días | 90 Días |
|-----------|--------|-------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 118 | 38 | 37 | 39 | 21 | 40 |
| 2 | 55 | 29 | 26 | 21 | 19 | 19 |
| 3 | 83 | 54 | 50 | 61 | 42 | 36 |
| 4 | 74 | 61 | 60 | 60 | 59 | 57 |
| 5 | 423 | 317 | 312 | 311 | 310 | 307 |
| 6 | 558 | 105 | 102 | 97 | 90 | 90 |
| 7 | 45 | 40 | 16 | 22 | - | - |
| 8 | 400 | 321 | 316 | 307 | 302 | - |
| 9 | 327 | 116 | 101 | 93 | - | - |
| 10 | 18 | 16 | 9 | 2 | - | - |
| 11 | 115 | 119 | 110 | 100 | 92 | 86 |
| 12 | 263 | 117 | 112 | 93 | 86 | - |
| 13 | 113 | 111 | 99 | 100 | 90 | 73 |
| 14 | 93 | 82 | 40 | - | - | - |
| 15 | 62 | 26 | 21 | 16 | 12 | 12 |
| 16 | 29 | 20 | 6 | - | - | - |
| 17 | 141 | 36 | 22 | 35 | 25 | 23 |
| 18 | 55 | 66 | 70 | 36 | 29 | 16 |
| 19 | 432 | 323 | 116 | 93 | - | - |
| 20 | 39 | 39 | 23 | 21 | 6 | 6 |
| 21 | 96 | 87 | 53 | 31 | - | - |
| 22 | 215 | 210 | 193 | 174 | 117 | 119 |
| 23 | 116 | 30 | 30 | 13 | 9 | - |
| 24 | 56 | 39 | 34 | 30 | 30 | - |
| \bar{X} | 163 | 99 | 82 | 73 | 55 | 37 |

0 Días - Recien emisión de la muestra antes de liofilizar

1, 15, 30, 60 y 90 Días después de liofilizar

- No detectada

\bar{X} Media calculada en cada intervalo de tiempo.



| Casos | 0 Días | | | 1 Día | | | 15 Días | | | 45 Días | | | 90 Días | | |
|-------|--------|---|---|-------|---|---|---------|---|---|---------|---|---|---------|---|---|
| | M | P | C | M | P | C | M | P | C | M | P | C | M | P | C |
| 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - |
| 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - |
| 4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 5 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| 6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 7 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 9 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 11 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 12 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 13 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 14 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 15 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 16 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 17 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 18 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 19 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 20 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 21 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 22 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 23 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 24 | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

0 Días - Recien emisión de la muestra antes de liofilizar

1, 15, 45 y 90 Días después de liofilizar

+ Presente

- Ausente

M = Macrófagos

P = Polimorfonucleares

C = Celulas epiteliales

Análisis de Resultados.

La determinación de Proteínas totales por el método de Biuret realizado a los 0 y 90 días, demostró un decremento en general de aproximadamente .80mg. Debe aclararse, que la determinación se realizó únicamente en estos dos lapsos debido a que la cantidad de muestra requerida para esta cuantificación es de 1 ml. (gráfica #1).

En la cuantificación de Potasio al igual que en la de Sodio se muestra un decremento y significativamente mayor en el de Sodio, como se puede observar en las gráficas 2 y 3.

En cuanto a la determinación de calcio, los valores se mantienen constantes hasta los 90 días presentando ligeras variaciones. (gráfica # 4).

Donde se presenta un decremento significativo es en la IgG a partir de los 15 días de extraída la muestra con una ausencia casi total a los 90 días. (gráfica # 5).

En caso de la IgM e IgA, ambas presentan una disminución, que se hace más evidente a partir de los 30 días de extraída la muestra en donde la cantidad se ha abatido hasta la mitad de su valor original. (gráficas 6 y 7).

Por lo que respecto al examen microscopico de la leche materna, se observaron células macrófagos, polimorfonucleares, y células epiteliales. (gráfica # 8).

CONCLUSIONES

Se considera que el contenido protéico de la leche materna se mantiene constante, aún después de la liofilización. La disminución de este es poco significativa.

El nivel de sodio, potasio y calcio, disminuye paulatinamente conforme transcurre el tiempo, después de liofilizar.

Las Inmunoglobulinas determinadas por el método de Inmuno-Difusión-Radial, también disminuyen al transcurrir el tiempo después de liofilizar, pero aún se encuentran presentes a los 90 días, lo que le confiere ventajas sobre las leches comerciales maternizadas, sobre todo en el caso de la IgM e IgA.

La presencia de la IgG, como se señaló anteriormente, no se mantiene en la mayoría de los casos a los 90 días, esto puede deberse a las características estructurales que le confieren una mayor labilidad.

Por todo lo anterior se concluye que el método de liofilización permite preservar, aunque no en su totalidad las características de la leche.

Se recomienda que la utilización de esta leche conservada por el método de liofilización, no rebase los 30 días, ya que después de este tiempo, la concentración de los constituyentes de esta es menor.

Se recomienda ampliar el tiempo de conservación de la leche materna humana, así como la realización de pruebas de estabilidad y consistencia reológica de la leche materna humana, a diferentes tiempos y temperaturas.

Bibliografía

- 1.- Arrieta Ramiro y Cravioto Joaquín.
Lactancia materna análisis crítico.
Primera edición.
Editorial del D.I.F.
México 1985.
- 2.- Alrashid R.A. and Spangler U.
Neonatal cooper deficiency.
New England. Journal medice vol. 285.
New England 1971.
- 3.- A. Ballcels.
Interpretación de análisis y pruebas funcionales.
Octava edición.
Editorial Marin, S.A.
Barcelona 1972.
- 4.- Bahan L. Sami, and Keller A. Margaret.
IgD and IgE in human calostrum and plasma.
Pediatric.
Pediatrics Res. 16. (1982).
- 5.- Corons I.
A check an a milk bank.
Nurs Times, 17, 23; 78(?) : supl 1-4.
England 1982.
- 6.- Charlott B. Neuman.
Clinical pediátricas de norte america.
(Nutrición en pediatria).
Editorial Interamericana.
Primera edición.
México, USA. 1977.
- 7.- Fomon S.J.
Infant nutrition.
Segunda edición.
Editorial W.B. Saunders.
Philadelphia Co. 1974.

- 8.- Goldman S. Harmon and Garza Cutberto.
Immunologic factors in human milk during
The first year of lactation
The journal of pediatrics. vol 100 (1982).
- 9.- Garza Cutberto y Johnson A. Cormen.
Métodos de colección y de cuantificación
de nutrientes en la leche humana.
Biomedical press. Human Development.
vol. 6, (1982).
- 10.- Hugh Fundenberg.
Inmunología Clínica. 3a. Edición.
Editorial "El manual moderno". Mex. 1983
- 11.- Ioviene-Selva.
El laboratorio en la clínica.
Segunda edición.
Editorial Panamericana.
México 1983.
- 12.- Lo B.L. Gordon
Lo esencial de la inmunología.
Segunda edición.
Editorial "El manual moderno".
México 1975
- 13.- Loenoczy G. and F. Kall.
Effect of non damaging heat on content of K
human milk.
Kinderarztl prox. 49 (7).
Germany 1981 (Jul).
- 14.- Macparson C. Talbot.
Standares for directories for
mothers milk.
Journals pediatrics. 15.
New Engrand 1975.

- 15.- M. Teresa Asquit.
Bacteriología de la leche humana
Revista de Infectología, año IV.
núm. 8.
México 1984 (Agosto).
- 16.- Piterd b. Willian and Bill B. Catllen.
Effect of refrigeration an celular components.
Clinical pediatrics. vol 20. (1981).
- 17.- Pecsak L. Robert and Donal Shil.
Métodos modernos de análisis clínicos.
Quinta edición.
Editorial Alambra.
México 1979.
- 18.- Pearay L. Ogra.
Inmunología de la leche humana
e interacciones madre e hijo.
Revista de Infectología, año IV.
núm. 11
- 19.- Pardou A.
Nutritional propertias of fresh human milk.
Rev. Med. Brux. 13:83 (14)
Frenh. 1983 (April).
- 20.- Pitard W.B.
Human milk banking; Effect of refrigeration
on celular components.
Clin. Pediatric 20 (I)
England 1981 (Jan).
- 21.- R. Beckterch.
Química clínica. teoria practica e interpretación.
49a. edición.
Editorial Salvat.
Barcelona 1984.

- 22.- Sodeman y Sodeman
Fisiopatología clínica.
Cuarta edición.
Editorial Interamericana
México 1979.
- 23.- Sushine Pot.
Human Brest Milk-storage and safety.
Considerations. Protective effects.
West J. med. 132 (1).
England 1970.
- 24.- Statement Nutrition Comite.
Human milk banking.
Canadian pediatria society 1:132 (7).
Canadian 1985 (April).
- 25.- Wardel M. Jean, Hill H.C. and D. Sousa W.
Effect of pasteuritation and freezing and
Thacing human milk an its trigliceride
content.
Acta pediatria, 70, (1981).
- 26.- Williams F.H. and Pitard W.B.
Human milk banking practical concerns
for feding premature infants.
J. AM Diet asoc. 79 (5).
England 1981 (Nov).
- 27.- Windr W. And A. Roter N.H.
Quality of brest milk: its control
and preservation.
Helv. pediatric. Acta 37 (2).
England 1982 (May).
- 28.- Williams Rojas M.
Inmunología.
Cuarta Edición.
Ed. Fondo educativo interamericano.
México 1983.

- 29.- Q. Organica.
Alberto Lens del Rio.
Cuarta edición.
Editorial patria.
México 1980.
- 30.- Todd-Stanford.
Diagnóstico clínico por el laboratorio.
Cuarta edición.
Editorial Salvat.
Barcelona 1981.
- 31.- Linnea Anderson.
Nutrición y dieta.
Decimoséptima edición.
Tomo II.
Enrrubia Lozano Editores.
México 1985.