



## Trabajo Original

Epidemiología y dietética

### Impacto de la pasteurización/liofilización en el contenido disponible de inmunoglobulinas en leche humana madura. Estudio de aplicación en bancos de leche humana en hospitales

*Impact of pasteurization/freeze-drying on available immunoglobulin content of the mature human milk. Use in human milk banking of hospitals*

Jorge Castro-Albarrán<sup>1,4</sup>, Rosa Elena Navarro-Hernández<sup>2,3</sup>, Josué Raymundo Solís-Pacheco<sup>1,2</sup>, Itza Carmina Salazar-Quiñones<sup>5</sup>, Griselda Guadalupe Macías-López<sup>2</sup>, Juan Carlos Barrera-De León<sup>4</sup> y Blanca Rosa Aguilar-Uscanga<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Procesos Biotecnológicos. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México. <sup>2</sup>Departamento de Farmacobiología. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México. <sup>3</sup>Departamento de Biología Molecular y Genómica. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México. <sup>4</sup>Hospital Materno-Infantil. E.L.M. Secretaría de Salud Jalisco. Guadalajara, Jalisco. México. <sup>5</sup>Departamento de Ciencias de la Salud y Ecología Humana. Centro Universitario Costa Sur. Universidad de Guadalajara. Autlán de Navarro, Jalisco. México

## Resumen

**Introducción:** este estudio analiza el efecto sobre el contenido de inmunoglobulinas y complemento C3 de la liofilización posterior a la pasteurización por tres métodos diferentes en leche humana madura (LHM).

**Objetivo:** la liofilización es propuesta como método complementario para el mantenimiento de las propiedades terapéuticas de la LHM con mayor vigencia.

**Métodos:** estudio descriptivo en el que se obtuvieron muestras de LHM. Alicuotas de las muestras obtenidas se pasteurizaron por tres métodos: 62,5 °C/30 minutos, 72 °C/15 minutos 85 °C/5 minutos, seguido de un enfriamiento rápido a 5 °C. Después, volúmenes de 30 ml de muestra pasteurizada fueron liofilizados durante un periodo de 36 horas. La determinación de proteínas totales fue realizada por el método Lowry. Las concentraciones de inmunoglobulinas A, G y M y el complemento C3 fueron determinadas por nefelometría convencional, siguiendo las instrucciones del fabricante. La significancia estadística se definió como  $p < 0,05$ .

**Resultados:** el método de pasteurización de LHM con mayor retención de proteína e inmunoglobulinas fue a la temperatura de 62,5 °C, sin embargo, la pasteurización a 72 °C antes de la liofilización mostró mayor retención de inmunoglobulinas.

**Conclusiones:** nuestros resultados sugieren que la liofilización de LHM pasteurizada es un método eficiente para la conservación en bancos de leche humana. Tanto la composición nutricional como la extensión de su vida útil y la aplicación de los dos procesos juntos proporcionan la ventaja de mantener las propiedades terapéuticas de la leche humana para mejorar la salud del recién nacido en estado vulnerable, desmedro o inmunosuprimido.

#### Palabras clave:

Inmunoglobulinas.  
Leche humana.  
Pasteurización.  
Liofilización. Bancos de leche.

## Abstract

**Introduction:** This study analyzes the effect on the content of immunoglobulins and C3 complement of freeze drying after pasteurization by three different methods in mature human milk (MHM).

**Objective:** Freeze drying is proposed as a complementary method for the maintenance of MHM therapeutic properties with greater validity.

**Methods:** This was a descriptive study in which MHM samples were obtained. Next, aliquots of the samples obtained were pasteurized by three methods: 62.5 °C/30 minutes, 72 °C/15 minutes, 85 °C/5 minutes, followed by a rapid cooling at 5 °C. Then, 30 ml volumes of pasteurized sample were freeze-dried over a period of 36 hours. Total protein determination was performed by the Lowry method. The concentrations of immunoglobulins A, G and M, and complement C3, were determined by conventional nephelometric technique following the manufacturer's instructions. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

**Results:** The method of pasteurization of MHM with increased protein and immunoglobulin retention was at 62.5 °C, however, pasteurization at 72 °C before freeze-drying showed better retention of immunoglobulins.

**Conclusions:** Our results suggest that the freeze-drying of pasteurized MHM is a suitable method for the conservation in human milk banks. Both the nutritional composition and the extension of its validity and the application of the two processes together provide the advantage of maintaining the therapeutic properties of human milk to improve the health of the newborn in a vulnerable, impaired or immunosuppressed state.

#### Key words:

Immunoglobulins.  
Human milk.  
Pasteurization. Freeze drying. Milk banks.

Recibido: 03/10/2016

Aceptado: 10/12/2016

Castro-Albarrán J, Navarro-Hernández RE, Solís-Pacheco JR, Salazar-Quiñones IC, Macías-López GG, Barrera-De León JC, Aguilar-Uscanga BR. Impacto de la pasteurización/liofilización en el contenido disponible de inmunoglobulinas en leche humana madura. Estudio de aplicación en bancos de leche humana en hospitales. Nutr Hosp 2017;34:899-906

DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.627>

#### Correspondencia:

Blanca-Rosa Aguilar-Uscanga. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. Boulevard Marcelino García Barragán, 1421. 44430 Guadalajara, Jalisco. México  
e-mail: [agublanca@gmail.com](mailto:agublanca@gmail.com)

## INTRODUCCIÓN

El contenido de macronutrientes, micronutrientes y componentes bioactivos de la leche humana (LH) es importante desde el punto de vista conceptual en el que es considerada la "nutrición perfecta" para los recién nacidos y lactantes (1,2), incluyendo el recién nacido prematuro (3). Es reconocida como el estándar de oro de la alimentación infantil, debido a su contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos y la relación de la concentración entre estos componentes, la cual varía de acuerdo al tiempo de evolución de la lactancia (4).

La LH es un biofluido bioquímicamente complejo y considerablemente variable que, a través de la evolución, ha adquirido las propiedades necesarias para alimentar y proteger de la enfermedad a la especie humana en la etapa temprana de la vida, mientras que su propio sistema inmunitario madura (2,5,6). La LH que produce la madre después del parto y durante el periodo de lactancia se clasifica en tres estadios: calostro (de uno a seis días), leche transicional (de siete a diez días) y leche madura (más de diez días), que corresponde a la composición estándar con menor variación nutricional, en especial en sus macronutrientes (2,4).

La LH contiene elementos bioactivos, entre los que se identifican las inmunoglobulinas, cuya síntesis tiene origen en el epitelio mamario o células mamarias. Son secretados en forma soluble y son transportados por receptores a través del epitelio mamario hacia el suero materno, y su importancia radica en que tienen impacto sustancial en procesos biológicos y funciones corporales (2).

Se han identificado diferentes componentes bioactivos en la LH, principalmente inmunoglobulinas, antioxidantes, interleucinas 1, 6, 8 y 10, factor de crecimiento transformante, inhibidores de proteasa de leucocitos, defensina-1, moléculas de adhesión, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, hormonas, factores antimicrobianos, oligosacáridos y mucinas (1). Estos son secretados en forma soluble, producto de la actividad celular en el tejido mamario, y poseen potencial para regular la diferenciación y maduración de células B, fuente exclusiva de inmunoglobulinas (1,4).

En el contexto de la respuesta inmune del recién nacido y lactante se ha demostrado que el consumo de LH favorece su protección inmunológica. En este sentido, el contenido de inmunoglobulinas se ha estudiado debido a que adquiere especial importancia por la actividad biológica que desempeñan. Las inmunoglobulinas A, G y M (IgA, IgG e IgM, respectivamente) y la fracción del complemento C3 participan en la protección inmunológica del lactante (7).

En LH madura (LHM) se estiman concentraciones para IgA, IgG e IgM de 1,0 a 2,0 g/l, 0,16 a 0,66 g/l y 0,04 a 0,15 g/l respectivamente (7), las cuales tienen funciones particulares. La IgA se produce en mayor cantidad específicamente en el calostro, su actividad se relaciona con evitar que los antígenos lleguen a la pared intestinal y neutralizar la acción de toxinas en la mucosa intestinal (2), y la única fuente de obtención para el recién nacido es a través de la LH. La IgM posee capacidad neutralizante, aglutinante y precipitante, fija el complemento por la vía clásica y activa la respuesta inmune, mientras que la IgG es capaz de atravesar membranas biológicas, es trascendente en la respuesta inmune

humoral y la defensa contra microorganismos, tiene la capacidad de neutralizar virus y posee actividad antimicrobiana (7).

Por otra parte, el componente C3 del complemento tiene la habilidad de producir lisis bacteriana al unirse con inmunoglobulinas, posee actividad opsónica, quimiotáctica y bacteriolítica, y su concentración en el suero materno es de  $436 \pm 118$  mg/l, con un rango de 240 a 800 mg/l (8).

En la práctica clínica se presenta la necesidad de implementar una nutrición a base de LH para los lactantes cuya condición nutricional es vulnerable: recién nacidos con bajo peso para su edad gestacional (3) y lactantes en desmedro o con otras enfermedades en las cuales no es factible la lactancia homóloga. En la actualidad no se tiene al alcance una fórmula artificial con propiedades y componentes bioactivos idénticos a los de la LH. Una estrategia a seguir es la alimentación con LH heteróloga a través de su conservación en bancos de LH, sin embargo, el reto actual es conservar los componentes bioactivos en cantidad y calidad recomendables el mayor tiempo posible.

Los bancos de LH son un modelo estratégico de atención y prevención a la salud de los lactantes, instituido por la Organización Mundial de la Salud, en los que existe reserva de LH con la calidad e inocuidad recomendadas (9). Con esta finalidad, se han desarrollado procesos biotecnológicos que incrementan la vigencia y aseguran la inocuidad de la LH. La metodología específica estándar consiste en la pasteurización por calentamiento sostenido (proceso a  $62,5$  °C por 30 minutos), con enfriamiento inmediato a temperatura menor de  $12$  °C y posterior congelamiento a  $-20$  °C durante un periodo máximo de seis meses (10).

En diversos estudios se reportan resultados controversiales con respecto al mantenimiento de los componentes bioactivos de la LH después de la pasteurización, mientras que con respecto al contenido de inmunoglobulinas no se ha establecido cuál es el mejor proceso de conservación.

En este estudio se analiza el efecto en el contenido de inmunoglobulinas y complemento C3 de tres métodos de pasteurización, y se propone como método complementario la liofilización, para incrementar las propiedades terapéuticas de la LHM con mayor tiempo de vigencia e inocuidad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### MUJERES DONANTES DE MUESTRA DE LHM

En este estudio descriptivo se seleccionó una muestra representativa de cuatro mujeres en etapa de puerperio, las cuales firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio y cumplieron los siguientes criterios: secundigestas, edad de 25 a 35 años, índice de masa corporal de  $18,5$  a  $24,9$  kg/m<sup>2</sup>, originarias del occidente de México, sin parentesco de consanguinidad entre ellas y sin signos ni síntomas de enfermedades, con historia clínica de evolución de la gestación, trabajo de parto, parto y posparto fisiológicos, recién nacido a término (37 a 41 semanas) con peso adecuado para su edad gestacional, evaluado clínicamente como saludable y con lactancia al seno materno exclusiva.

## EXAMEN E HISTORIA CLÍNICA DE LAS MADRES Y SUS RECIÉN NACIDOS

El protocolo y la recolección de la LH fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética y Bioseguridad del Hospital Materno-Infantil E.L.M. de la Secretaría de Salud Jalisco. Todas las mujeres y sus recién nacidos que cumplieron con los criterios de estudio fueron evaluados clínicamente por un médico especialista, ginecoobstetra y perinatólogo, respectivamente, quienes llevaron a cabo la historia clínica completa, evaluación del estatus de salud general y medición de signos vitales.

## RECOLECCIÓN DE LA LHM

Durante el periodo de lactancia de 15 a 30 días posparto, cada madre, en tres días consecutivos, donó un volumen total de 500 ml de LHM, que se recolectó por la mañana (4). En condiciones de asepsia de rutina, la leche se extrajo utilizando una bomba de extracción mecánica (Freestyle® Breastpump® 2016 Medela, Inc., McHenry, IL), previo masaje de acuerdo a la técnica de Marmet (11). Porciones de las muestras obtenidas se analizaron y pasteurizaron inmediatamente.

## PROCESOS DE CONSERVACIÓN APLICADOS A LAS MUESTRAS DE LHM

Volúmenes de 50 ml de la LHM obtenida se pasteurizaron por triplicado con tres métodos: 62,5 °C durante 30 minutos, 72 °C durante 15 minutos y 85 °C durante cinco minutos (en frascos de boro silicato), seguido de un enfriamiento rápido en baño maría inverso a una temperatura de 5 °C. La pasteurización a 62,5 °C durante 30 minutos se realizó en un pasteurizador PAS 10000-HSC (HSC Neonatología; HSC, Décines-Charpieu, Francia); para la pasteurización con las temperaturas de 72 y 85 °C se utilizó baño de agua (HB 4000 Digit, Heidolph Heating Bath HB eco, Suarlee, Bélgica).

De cada muestra pasteurizada, volúmenes de 30 ml fueron liofilizados durante un periodo de 36 horas en el liofilizador Freezone 4.5L modelo 7750041 (FreeZone® 4.5 Liter Freeze Dry Systems Labconco Corporation, Kansas City, Estados Unidos, MO 64132-2696) a temperatura de -55 °C, recolectando el polvo de leche para el análisis de componentes biológicos (12).

## ANÁLISIS DE COMPONENTES BIOACTIVOS EN LA LHM

La determinación de proteínas se realizó en las muestras sin tratamiento y en las muestras pasteurizadas por el método de Lowry (13), mientras que la concentración de inmunoglobulinas y C3 se realizó en cada muestra por triplicado, en tres momentos: a) inicial o sin tratamiento; b) después de la pasteurización; y c) después de la liofilización. Se empleó la técnica de nefelometría

convencional, la cual se basa en la cuantificación de la luz dispersada por complejos antígeno-anticuerpo formados durante la inmunoprecipitación en fase líquida (14), con rangos de medición de 0,21 a 5,9 g/l para IgA, de 2,8 a 27,6 g/l para IgG, de 0,23 a 3,77 g/l para IgM, y de 15,5 a 502 mg/dl para C3 (Randox Laboratories; Antrim, Irlanda del Norte, Reino Unido).

Las muestras liofilizadas fueron reconstituidas con aproximadamente 9 ml que corresponden al diluyente (agua inyectable) por cada gramo de leche en polvo, para restablecer la humedad original de la LHM antes de su procesamiento.

De las muestras pasteurizadas y liofilizadas reconstituidas, se centrifugaron 1,5 ml a 3.000 rpm durante diez minutos a 4 °C. En el sobrenadante obtenido se analizaron los componentes bioactivos. El análisis de proteínas se realizó en la muestra completa.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de las variables se realizó comparando los resultados de cada método de pasteurización o liofilización con la evaluación inicial, con los paquetes estadísticos IBM-SPSS v21 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos), Statgraphics Centurion XVII (2010 StatPoint Technologies, Inc., Estados Unidos) y GraphPad Prism v6.00.283 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos). Prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias significativas se definieron como  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Este grupo de mujeres donantes de LHM con edad de 30 años en promedio presentaron producción espontánea y fisiológica de leche y estado saludable de ellas y sus recién nacidos, con peso de 3,2 kg en promedio al nacimiento.

Los resultados obtenidos del contenido de proteína total muestran tendencia a la disminución sin diferencia entre las concentraciones de  $17,60 \pm 2,77$  g/l y  $16,57 \pm 2,86$  g/l, cuando se incrementa la temperatura de pasteurización (de 62,5 a 85 °C) (Tabla I).

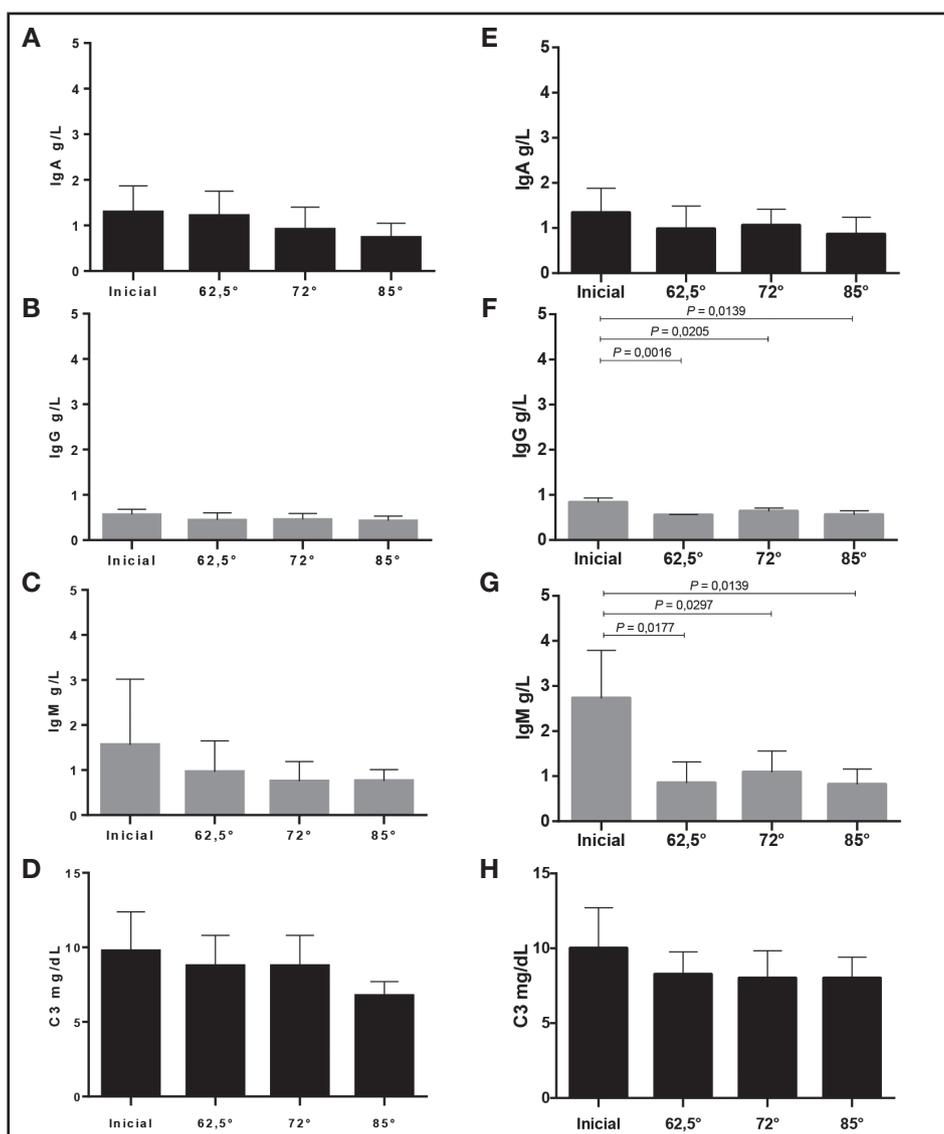
El contenido de inmunoglobulinas A, G y M y C3 en la LHM tiende a disminuir con los tres procesos de pasteurización (62,5, 72 y 85 °C) con respecto al contenido inicial (Fig. 1A-D). Mientras que con el proceso de liofilización después de la pasteurización a 62,5, 72 y 85 °C, se observó disminución en el contenido de IgG e IgM respecto a su concentración inicial, con menor pérdida en el proceso de pasteurización a 72 °C, comparado con la pasteurización a 62,5 °C y 85 °C (Fig. 1F y G), al mismo tiempo que los contenidos de IgA y C3 se mantienen constantes (Fig. 1E y H).

Proporcionalmente, la temperatura de pasteurización a 62,5 °C mostró mejor eficiencia en la retención de proteínas e inmunoglobulinas, con el siguiente patrón de comportamiento: 62,5 °C mejor que 72 °C, y este a su vez mejor que 85 °C, para los componentes analizados, proteínas totales, IgA e IgM, con excepción de IgG, que presentó el mejor rendimiento a 72 °C (Tabla II).

**Tabla I.** Contenido de proteínas totales en leche humana madura a diferentes temperaturas de pasteurización

|                | Temperatura (°C) |              |              |              | p  |
|----------------|------------------|--------------|--------------|--------------|----|
|                | Inicial          | 62,5         | 72           | 85           |    |
| Proteína (g/l) | 17,24 ± 1,29     |              |              |              |    |
|                |                  | 17,60 ± 2,77 |              |              | NS |
|                |                  |              | 16,78 ± 2,21 |              | NS |
|                |                  |              |              | 16,57 ± 2,86 | NS |

Contenido de proteína (media y desviación estándar). p comparando contenido inicial de proteína versus después de la pasteurización en cada método. NS: no significativo.



**Figura 1.**

Efecto de la pasteurización y liofilización sobre los niveles de inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgG) y complemento C3 en leche humana madura. A-D. Niveles de inmunoglobulinas en leche humana madura pasteurizada. E-H. Niveles de inmunoglobulinas en leche humana madura liofilizada después del proceso de pasteurización. Inicial: sin procesamiento; 62,5°, 72°, 85° temperaturas de pasteurización en grados Celsius. Comparación entre el valor inicial versus el resultado después de la pasteurización.

**Tabla II. Retención del contenido de componentes bioactivos en los tratamientos de pasteurización en este estudio y comparativo con estudios previos**

| Biocomponente     | Condiciones de pasteurización |               | Retención |
|-------------------|-------------------------------|---------------|-----------|
|                   | Temperatura (°C)              | Tiempo (min.) | %         |
| Proteínas totales | 62,5                          | 30            | 100*      |
|                   | 72                            | 15            | 97,4*     |
|                   | 85                            | 5             | 96,1*     |
|                   | 62,5                          | 30            | 96,1 (28) |
| IgA               | 62,5                          | 30            | 93,7*     |
|                   | 72                            | 15            | 70,5*     |
|                   | 85                            | 5             | 56,5*     |
|                   | 62,5                          | 30            | 100 (19)  |
|                   | 62,5                          | 30            | 80,0 (24) |
|                   | 62,5                          | 30            | 79,0 (29) |
|                   | 62,5                          | 30            | 72,9 (30) |
|                   | 62,5                          | 30            | 74,1 (31) |
|                   | 62,5                          | 30            | 67,0 (32) |
|                   | 62,5                          | 30            | 60,0 (33) |
|                   | 62,5                          | 30            | 38,0 (22) |
|                   | 62,5                          | 5             | 77,0 (32) |
|                   | 56                            | 30            | 90,0 (32) |
|                   | 56                            | 30            | 81,0 (34) |
|                   | 70                            | 30            | 67,7 (19) |
|                   | 72                            | 0,25          | 83,7 (20) |
|                   | 72                            | 0,25          | 80,0 (35) |
|                   | 72                            | 0,25          | 64,0 (23) |
| 87                | 0,25                          | 13,5 (23)     |           |
| IgG               | 62,5                          | 30            | 78,9*     |
|                   | 72                            | 15            | 80,7*     |
|                   | 85                            | 5             | 75,4*     |
|                   | 62,5                          | 30            | 66,0 (19) |
|                   | 62,5                          | 30            | 27,0 (22) |
|                   | 70                            | 30            | 02,6 (22) |
|                   | 72                            | 0,25          | 67,0 (21) |
|                   | 72                            | 0,25          | 58,0 (23) |
| IgM               | 62,5                          | 30            | 61,5*     |
|                   | 72                            | 15            | 48,0*     |
|                   | 85                            | 5             | 48,7*     |
|                   | 62,5                          | 30            | 100 (23)  |
|                   | 62,5                          | 30            | 0 (24)    |
|                   | 62,5                          | 30            | 0 (22)    |

IgA, IgG e IgM: inmunoglobulina A, G y M, respectivamente; C3: proteína 3 del complemento. \*Resultados de este estudio. Bibliografía entre paréntesis.

Adicionalmente, en la tabla II se muestran los porcentajes de retención reportados en estudios previos, en los que se evaluó el contenido de proteínas e inmunoglobulinas después de procesos de pasteurización similares a los aplicados en este estudio. La retención evaluada representa la cantidad en masa de los componentes bioactivos después del proceso de pasteurización; en este contexto es la recuperación total en cantidad y calidad recomendable.

Para IgA e IgM, la estimación de la combinación pasteurización a 72 °C durante 15 minutos y liofilización mostró la mejor retención, del 82,1% y 69,8% respectivamente.

La proporción por litro de LHM de componentes bioactivos evaluados se muestra en la tabla III, donde se observan el 12,84% y el 3,09% en total y de inmunoglobulinas, respectivamente. Se muestra una comparación adicional con estudios previos.

## DISCUSIÓN

En este estudio se pondera el contenido de los componentes bioactivos de la LHM con base en que actualmente se han desarrollado procesos biotecnológicos que incrementan su vigencia y aseguran la inocuidad, ya sea por pasteurización o por liofilización, mientras que se desconoce su efecto en la disponibilidad de sus componentes biológicamente activos.

En este contexto, sugerimos una estrategia en el uso conjunto de ambos métodos alternando diferentes temperaturas y tiempos en la pasteurización, con la propuesta de implementar la liofilización como método complementario para extender la vigencia y asegurar la inocuidad, al mismo tiempo que se conservan las propiedades terapéuticas de la LH en relación al contenido de proteínas, inmunoglobulinas y complemento C3, y con la ventaja de que una vez liofilizada la LH, el médico pediatra puede adecuar el tratamiento en contenido de componentes bioactivos de acuerdo a las necesidades nutricias y terapéuticas del lactante.

**Tabla III.** Contenido de inmunoglobulinas A, M y G y complemento C3 en leche humana en este estudio y estudios previos

| %I de leche humana |       |      |      |                      |                      |
|--------------------|-------|------|------|----------------------|----------------------|
| IgA                | IgG   | IgM  | C3   | Suma de componentes* |                      |
| 1,17               | 0,51  | 1,41 | 9,75 | 12,84                | (IgA, IgG, IgM, C3)  |
| 1,17               | 0,51  | 1,41 | -    | 3,09                 | (IgA, IgG, IgM)      |
| 2,04               | 0,04  | 0,1  | -    | 2,09                 | (IgA, IgG, IgM) (22) |
| 0,71               | 0,003 | -    | 0,01 | 0,73                 | (IgA, IgM, C3) (19)  |
| 0,45               | -     | 0,09 | -    | 0,54                 | (IgA, IgM) (24)      |
| 0,36               | 0,12  | -    | -    | 0,48                 | (IgA, IgG) (21)      |
| -                  | -     | -    | 0,14 | -                    | (C3) (17)            |
| -                  | -     | -    | 0,03 | -                    | (C3) (8)             |

\*Suma de las concentraciones de los componentes evaluados en los respectivos estudios. IgA, IgG e IgM: inmunoglobulina A, G y M respectivamente; C3: proteína 3 del complemento. Bibliografía entre paréntesis.

En las muestras analizadas de nuestro grupo de estudio encontramos similitud para la concentración de proteínas, de 17,24 a 16,57 g/l al inicio y después del proceso de pasteurización, independientemente de la temperatura de exposición. Estos niveles son mayores a los publicados previamente por Michaelsen en 1990, quien reportó concentraciones de 9 a 12 g/l de proteínas (15). Otros autores reportan que el contenido total de proteínas que incluyen las inmunoglobulinas se reduce por la pasteurización (16).

A este respecto, se han identificado más de 400 proteínas diferentes en la leche humana y de acuerdo a sus características bioquímicas se dividen en tres grupos: caseínas, suero de leche y proteínas de mucina, con funciones sustanciales como actividad inmunomoduladora y antimicrobiana, absorción y metabolismo de nutrientes y precursoras de diferentes péptidos biológicamente activos (2).

Otros estudios reportan diferentes niveles en el contenido de proteínas, y se observan divergencias entre mujeres lactantes, hora y espacio de tiempo entre lactadas. En este sentido, el tiempo y la etapa de producción de LHM por la glándula mamaria definen sus características bromatológicas y nutrimentales. A este respecto, y no obstante que estandarizamos la obtención de las muestras de LHM con los criterios de inclusión, en este estudio consideramos como una limitación el número de las donadoras voluntarias, por lo que sugerimos la ampliación en el número de muestras a estudiar en nuevos estudios.

En este estudio, la variación en temperatura/tiempo de los tres métodos de pasteurización aplicados a la LHM no tiene efecto en el perfil de inmunoglobulinas y complemento C3 evaluado. Sin embargo, cuando se aplicó el proceso de liofilización observamos disminución en los niveles de IgG e IgM.

Tomando en cuenta que la diversidad en la composición de la LHM en el escenario de la lactancia es dependiente de la etapa y duración de esta, los estudios que evalúan el contenido de inmunoglobulinas reportan resultados controversiales (16), mostrando niveles de 1,0 a 2,0 g/l para IgA, de 0,16 a 0,66 g/l para IgG y de 0,04 a 0,15 g/l para IgM en LHM (16). A este respecto, en las muestras incluidas en este estudio encontramos concentraciones parcialmente similares (IgA 1,29 g/l, IgG 0,57 g/l e IgM 1,56 g/l), mientras que para el complemento C3 se reportan concentraciones de 19,93 ± 1,63 mg/dl para LH en etapa de calostro (16) y 16 mg/dl en LHM (17), que contrastan con los niveles encontrados en nuestro estudio 9,75 ± 2,62 mg/dl.

Asimismo, observamos que la concentración de inmunoglobulinas A, G y M y C3 en la LHM tiende a la disminución con los tres procesos de pasteurización con respecto a las concentraciones iniciales, cuando se incrementa la temperatura de pasteurización de 62,5 a 72 y 85 °C.

Este efecto se puede explicar debido a que la desnaturalización de las inmunoglobulinas se observa en un rango de temperatura de 62,5 a 81,7 °C (18); el orden de termoestabilidad puede ser atribuido a sus diferentes pesos moleculares, teniendo en cuenta que un mayor peso molecular implica menor termorresistencia y se puede referenciar en el siguiente orden: IgG > IgA > IgM, siendo la IgG más termorresistente e IgM, la inmunoglobulina más termolábil.

La evaluación de la retención como un indicador de la disponibilidad de los componentes bioactivos en la LHM mostró 93,7%, 78,9%, 61,5% y 89,7% para IgA, IgG, IgM y complemento C3, respectivamente. Estos porcentajes son mayores a los reportados en otros estudios en condiciones similares, a excepción de lo reportado por Evans y cols. en 1978 para los niveles de IgA con pasteurización a 62,5 °C, por Goldblum y cols. en 1984 y por Chantry y cols. en 2009, con pasteurización a 72 °C (16,19-21).

A este respecto, en la evaluación de retención de inmunoglobulinas en la LH después de un proceso de pasteurización los reportes son recientes pero escasos, y la información obtenida por otros autores (16,19,21-23) es de 27 a 67%. Específicamente, para IgM en la pasteurización a 62,5 °C durante 30 minutos se reporta pérdida significativa con respecto a la concentración inicial (16,22-24). La importancia de la IgM radica en que, en respuesta a un estímulo antigénico, rápidamente incrementa su concentración y se caracteriza por poseer capacidad neutralizante, precipitante y aglutinante (25).

Similarmente, en este estudio observamos mayor variación en el contenido de IgM después de los procesos de pasteurización y liofilización, lo que se explica por la característica particular con respecto a su peso molecular, que le confiere menor termoestabilidad que IgA e IgG (18). A este respecto, otros estudios reportan que la pasteurización afecta los niveles de IgM en grado variable, sin cuantificar el nivel de degradación. Sin embargo, en la práctica clínica se ha confirmado que, en su mayor parte, las propiedades favorables de la leche materna permanecen incluso después de la pasteurización (16).

Por otra parte, la función, concentración y conservación de la IgA en la LH se reporta en un mayor número de estudios con respecto a otras inmunoglobulinas, por lo que en la literatura científica existen diversos estudios con resultados controversiales (16). Estos contrastes se pueden explicar por una parte porque los métodos aplicados en la pasteurización y evaluación de los componentes bioactivos difieren en características de tecnología e infraestructura y, por otra parte, por el momento histórico-social en que fueron evaluados, debido a que existen reportes a lo largo de tres décadas.

Según los resultados de este estudio, podemos sugerir que la pasteurización a 62,5 °C durante 30 minutos es el proceso que conserva en mayor proporción el contenido de la suma de los componentes bioactivos de la LHM evaluados, mientras que la liofilización es aplicable de manera independiente.

Los métodos aplicados a la conservación de la LH deben garantizar su inocuidad debido a que se ha reportado que puede ser un vehículo de transmisión de virus (26), al mismo tiempo que su importancia es reconocida porque se considera que posee propiedades antioxidantes, con la limitante de que varían de acuerdo a la historia obstétrica y edad de las madres lactantes (27).

Por ello, es recomendable ampliar la información disponible en otros estudios en los que se integren nuevas tecnologías y se eviten sesgos potenciales, con el objetivo de estandarizar la valoración del efecto conjunto de la pasteurización y liofilización de la LH, al mismo tiempo que se garantice su calidad biológica e inocuidad.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la liofilización de LHM pasteurizada es un método eficiente para la conservación en bancos de leche humana. Tanto en su composición nutricional como en la extensión de la vida de anaquel, la aplicación de los dos procesos proporciona la ventaja de mantener las propiedades terapéuticas de la leche humana para mejorar la salud del recién nacido.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo otorgado por el Posgrado en Ciencias en Procesos Biotecnológicos del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 2013;60(1):49-74.
2. Andreas NJ, Kampmann B, Le-Doare KM. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev* 2015;91(11):629-35.
3. Torres G, Argés L, Alberto M, Figueroa R. Leche humana y nutrición en el prematuro pequeño. *Nutr Hosp* 2004;19(4):236-42.
4. Ren X, Yang Z, Shao B, Yin SA, Yang X. B-vitamin levels in human milk among different lactation stages and areas in China. *PLoS One* 2015;10(7):e0133285.
5. Sharma AA, Jen R, Butler A, Lavoie PM. The developing human preterm neonatal immune system: A case for more research in this area. *Clin Immunol* 2012;145(1):61-8.
6. Cordero MJA, Baños NM, García LB, Villar NM, Barrilao RG, López AMS. Lactancia materna como método para prevenir alteraciones cardiovasculares en la madre y el niño. *Nutr Hosp* 2015;31(n05):1936-46.
7. Goldman AS. The immune system of human milk: Antimicrobial, anti-inflammatory and immunomodulating properties. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12(8):664-72.
8. Trégoat V, Montagne P, Cuillière M-L, Béné M-C, Faure G. C3/C4 concentration ratio reverses between colostrum and mature milk in human lactation. *J Clin Immunol* 1999;19(5):300-4.
9. Arnold LD, Larson E. Immunologic benefits of breast milk in relation to human milk banking. *Am J Infect Control* 1993;21(5):235-42.
10. Carratù B, Ambruzzi AM, Fedele E, Sanzini E. Human milk banking: Influence of different pasteurization temperatures on levels of protein sulfur amino acids and some free amino acids. *J Food Sci* 2005;70(6):c373-c5.
11. Marmet C. Manual expression of breast milk: Marmet technique. *Breastfeeding Information Guide* 2000:41-2.
12. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: Putting principles into practice. *Eur J Pharm Biopharm* 1998;45(3):221-9.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
14. Montagne P, Laroche P, Bessou T, Cuillière ML, Varcin P, Duheille J. Measurement of eleven serum proteins by microparticle-enhanced nephelometric immunoassay. *CCLM* 1992;30(4):217-22.
15. Michaelsen KF, Skafte L, Badsberg JH, Jørgensen M. Variation in macronutrients in human bank milk: Influencing factors and implications for human milk banking. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;11(2):229-39.
16. Peila C, Moro GE, Bertino E, Cavallarin L, Giribaldi M, Giuliani F, et al. The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: A review. *Nutrients* 2016;02;8(8).
17. Jagadeesan V, Reddy V. C3 in human milk. *Acta Paediatr Scand* 1978;67(2):237-8.
18. Mainer G, Sánchez L, Ena J, Calvo M. Kinetic and thermodynamic parameters for heat denaturation of bovine milk IgG, IgA and IgM. *J Food Sci* 1997;62(5):1034-8.
19. Evans T, Ryley H, Neale L, Dodge J, Lewarne V. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. *Arch Dis Child* 1978;53(3):239-41.

20. Goldblum RM, Dill CW, Albrecht TB, Alford ES, Garza C, Goldman AS. Rapid high-temperature treatment of human milk. *J Pediatr* 1984;104(3):380-5.
21. Chantry CJ, Israel-Ballard K, Moldoveanu Z, Peerson J, Coutsoudis A, Sibeko L, et al. Effect of flash-heat treatment on immunoglobulins in breastmilk. *J Acquir Immune Defic Syndr (1999)* 2009;51(3):264.
22. Koenig Á, De Albuquerque Diniz EM, Barbosa SFC, Vaz FAC. Immunologic factors in human milk: The effects of gestational age and pasteurization. *J Hum Lact* 2005;21(4):439-43.
23. Goldsmith SJ, Dickson JS, Barnhart HM, Toledo RT, Eiten-Miller RR. IgA, IgG, IgM and lactoferrin contents of human milk during early lactation and the effect of processing and storage. *J Food Prot* 1983;46(1):4-7.
24. Ford J, Law B, Marshall VM, Reiter B. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. *J Pediatr* 1977;90(1):29-35.
25. Capasso L, Borrelli AC, Parrella C, Lama S, Ferrara T, Coppola C, et al. Are IgM-enriched immunoglobulins an effective adjuvant in septic VLBW infants. *Ital J Pediatr* 2013;39:63.
26. García-Loygorri MC, De Luis D, Torreblanca B, March GA, Bachiller MR, Eiros JM. Breast milk as a vehicle of transmission of virus. *Nutr Hosp* 2015;32(1):4-10.
27. Castillo-Castaneda PC, Gaxiola-Robles R, Méndez-Rodríguez LC, Zenteno-Savín T. Antioxidant defences in breast milk in relation to number of pregnancies and age of mothers. *Nutr Hosp* 2014;30(3):540-7.
28. Vieira AA, Soares FVM, Pimenta HP, Abranches AD, Moreira MEL. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Hum Dev* 2011;87(8):577-80.
29. Gibbs JH, Fisher C, Bhattacharya S, Goddard P, Baum J. Drip breast milk: Its composition, collection and pasteurization. *Early Hum Dev* 1977;1(3):227-45.
30. Czank C, Prime DK, Hartmann B, Simmer K, Hartmann PE. Retention of the immunological proteins of pasteurized human milk in relation to pasteurizer design and practice. *Pediatr Res* 2009;66(4):374-9.
31. Chang J-C, Chen C-H, Fang L-J, Tsai C-R, Chang Y-C, Wang T-M. Influence of prolonged storage process, pasteurization, and heat treatment on biologically-active human milk proteins. *Pediatr Neonatol* 2013;54(6):360-6.
32. Wills M, Han V, Harris D, Baum J. Short-time low-temperature pasteurisation of human milk. *Early Hum Dev* 1982;7(1):71-80.
33. Akinbi H, Meinen-Derr J, Auer C, Ma Y, Pullum D, Kusano R, et al. Alterations in the host defense properties of human milk following prolonged storage or pasteurization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51(3):347-52.
34. Stephens S, Dolby J, Montreuil J, Spik G. Differences in inhibition of the growth of commensal and enteropathogenic strains of *Escherichia coli* by lactotransferrin and secretory immunoglobulin A isolated from human milk. *Immunol* 1980;41(3):597.
35. Chantry CJ, Wiedeman J, Buehring G, Peerson JM, Hayfron K, K'Aluoch O, et al. Effect of flash-heat treatment on antimicrobial activity of breastmilk. *Breastfeeding Med* 2011;6(3):111-6.