

ARTÍCULOS ORIGINALES

COMPARACIÓN DEL CONTENIDO CALÓRICO DE LA LECHE MATERNA FRESCA Y CONGELADA UTILIZANDO EL MÉTODO DEL CREMATOCRITO, EN POBLACIÓN RESIDENTE DE GRAN ALTITUD, LA PAZ, BOLIVIA.

COMPARISON OF CALORIE CONTENT OF FRESH AND FROZEN MILK USING THE CREMATOCRITO METHOD, IN HIGH ALTITUDE RESIDENT POPULATION, LA PAZ, BOLIVIA.

José Luis San Miguel Simbrón¹, Pamela Ticona Gutiérrez², Maruska Muñoz Vera³, Elva Espejo Aliaga⁴, Ana María Aguilar Liendo⁵, Noelia Urteaga Mamani⁶.

¹Especialista Médico Pediatra Inmunólogo, Docente investigador Titular Emérito, Instituto de Investigación en Salud y desarrollo (IINSAD), Jefe de la Unidad de Crecimiento y Desarrollo, (UCREDE-IINSAD), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés (UMSA).

²Auxiliar de Investigación, de la Unidad de Crecimiento y Desarrollo, (UCREDE-IINSAD), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés (UMSA).

³MSc, Lic. Laboratorio Clínico, Encargada del Laboratorio de Biología Atómica, Asistente titular de investigación, (UCREDE-IINSAD), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés (UMSA).

⁴Médico Cirujano, Tesista de maestría de la UCREDE-IINSAD, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés (UMSA).

⁵Especialista Médico Pediatra, Docente investigador Titular, (IINSAD), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés (UMSA).

⁶MSc. Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas, (UCREDE-IINSAD), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés (UMSA).
Unidad de Crecimiento y Desarrollo Infanto-Juvenil, Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2246. La Paz, Bolivia.

Autor para correspondencia: José Luis San Miguel Simbrón, josanto10@yahoo.es

RECIBIDO: 02/09/2016

ACEPTADO: 09/09/2016

RESUMEN

El estudio del valor calórico de la leche materna es de gran importancia en las primeras etapas de crecimiento del niño. El uso del crematocrito, permite determinar el aporte energético de la leche materna.

Pregunta de investigación: ¿Cuál será el contenido calórico de leche materna, a partir de un volumen preciso de leche, medido a través de la técnica del crematocrito, en muestras de leche fresca y congelada, en población de gran altitud, La Paz, Bolivia, gestión 2015?.

Objetivo general: Determinar el contenido calórico de leche materna, a partir de un volumen preciso, medido a través de la técnica del crematocrito, en muestras de leche fresca y congelada, en población de gran altitud, La Paz, Bolivia, gestión 2015.

Metodología: estudio descriptivo transversal, en 43 muestras de leche materna fresca y 43 muestras de leche post congelación entre - 8a -20°C, provenientes de muestras de leche de madres en niños menores de 2 años, de zonas periurbana de la ciudad de La Paz, a 3700 metros de altitud.

Resultados: La diferencia promedio del valor de crematocrito medido en muestras de leche materna fresca y congelada, es de 1.4 ± 1.2 %, y la diferencia en contenido calórico es de 90.2 kcal.

Conclusiones: Se ha demostrado que existe una disminución del contenido de grasa y el aporte calórico en muestras de leche materna congelada en comparación con muestras de leche fresca, esta reducción fue mayor en las muestras con mayor cantidad de tiempo de congelación.

Palabras claves: Crematocrito, leche materna, grasa de leche, aporte calórico, gran altitud.

ABSTRACT

The study of the caloric value of breast milk is of great importance in the early stages of growth of the child. The crematocrito usage permits, to determine the energy contribution of breast milk.

Research question: *What will be the calorie content of breast milk from a precise volume of milk, measured by the technique of crematocrito in samples of fresh and frozen milk in population of high altitude, La Paz, Bolivia, term 2015.*

General Objective: *To determine the calorie content of breast milk from a precise volume, measured by the technique of crematocrito in samples of fresh and frozen milk in population of high altitude, La Paz, Bolivia, term 2015.*

Methodology: *It was a descriptive cross-sectional study, 43 samples of fresh milk and 43 milk samples after freezing at - the 8th -20 ° C, from milk samples from mothers in children under 2 years of peri-urban areas of the city of La Paz, at 3700 meters altitude.*

Results: *The average difference of crematocrito value measured in samples of fresh and frozen breast milk is $1.4 \pm 1.2\%$, and the difference in calorie content is 90.2 kcal.*

Conclusions: *It has been shown that there is a decrease in fat and caloric intake in samples of frozen breast milk samples compared to fresh milk, this reduction was greater in samples with greater amount of freezing time.*

Keywords: *Crematocrito, breast milk, milk fat, calories, high altitude.*

INTRODUCCIÓN

La leche materna se ha constituido desde tiempos ancestrales en una fuente importante de nutrientes en los primeros meses de vida, no solo incluye al ser humano, también a muchas otras especies¹. Su importancia radica en su contenido como ser el agua, lípidos, proteínas, lactosa, vitaminas, minerales, enzimas y otros, es de vital importancia el componente inmunológico que no es reemplazado por ningún otro sustituto.² También se han identificado diferentes factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento similares a la insulina.³ Al ser la leche materna un alimento trascendente para los lactantes, en el crecimiento y desarrollo, han surgido diversas organizaciones e instituciones para promover la lactancia materna y ayudar a las madres que presenten dificultades para la misma.⁴ Por estas iniciativas nacieron los bancos de leche, donde se realiza la recolección, almacenamiento y posterior distribución de la leche materna. En estos bancos uno de los procedimientos que se lleva a cabo es la cuantificación de porcentajes de crema presentes en cada muestra previamente a su almacenamiento.⁵ En Bolivia existe un banco de leche, que está ubicado en la ciudad de La Paz y fue inaugurado el 2014.⁶ En el mismo, al igual que en

muchos otros bancos de leche de Latinoamérica, la cuantificación de porcentajes de crema se realiza previa pasteurización y almacenamiento.⁷ Siguiendo los procesos normados para una buena distribución con tiempos establecidos, se debe tomar en cuenta que la crema de la leche al ser modificada en el tiempo de conservación, esta cambiaría en la cantidad de la grasa y el aporte energético de la leche materna.

En el mundo se trabaja cada vez más para incentivar a las madres a dar leche materna a sus niños, esta práctica ancestral se ha visto disminuida en el último siglo;⁴ la posibilidad de almacenar la leche materna así como la aparición de los bancos de leche ha contribuido a sensibilizar a las madres a dar seno materno en los últimos años. En Estados Unidos hasta el 2010 se tiene una prevalencia de lactancia materna del 75%, los países nórdicos, Japón, Canadá y Nueva Zelanda son los que muestran prevalencias altas (71 a 85%), mientras que países como Reino Unido, Irlanda y Francia muestran prevalencias inferiores (15 a 43%).⁸ La prevalencia mundial de la lactancia materna se encuentra alrededor del 40%, la posibilidad de un almacenamiento seguro incrementaría estos porcentajes. En Bolivia según la encuesta ENDSA del 2008 el 98% de los niños han lactado

alguna vez y el 60% ha recibido lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses; sin embargo, una cuarta parte de los niños recibió un alimento diferente a la lactancia materna durante los primeros tres días de vida,⁹ este es un porcentaje alto que tiene una mayor prevalencia en el área urbana que en área rural, así como en madres con educación superior y en madres con mejores ingresos económicos, además la prevalencia de lactancia materna disminuye con la edad del lactante llegando al 44% en menores de 5 meses. El trabajo de los bancos de leche es cada vez mayor, en España el banco de leche incremento su actividad en 333 receptores de leche en el 2009 a 1436 receptores en el 2014.¹⁰ En la actualidad se necesitan estudios que se adecuen a los diferentes estilos de vida así como los nuevos métodos y procesos que incluyen la conservación de la leche materna.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el contenido calórico, a partir de la medición del volumen preciso de leche materna, mediante la técnica del crematocrito, en muestras de leche fresca y congelada, en población residente de gran altitud, en la ciudad de La Paz, Bolivia, gestión 2015.

Crematocrito

El crematocrito es una técnica analítica que permite determinar la crema de la leche,¹¹ y realizar el cálculo de la grasa y el aporte energético de la leche materna. Esta técnica es semejante al micro hematocrito, debiéndose utilizarse leche materna en vez de sangre humana. Fue descrita por primera vez por Flet y Linzetl en 1963, ellos encontraron un método para medir la concentración de grasa en leche de ratas. Este método consistía en la centrifugación de la leche en tubos capilares, leyendo el sobrenadante expresándolo en porcentaje.⁷ En 1978, Lucas y colaboradores aplicaron el mismo método para la leche humana.

El método se basa en el principio de densidad de los componentes de la leche materna, al ser la grasa más densa esta se localiza en la parte distal del tubo capilar.

METODOLOGÍA

El trabajo fue realizado en una mayor proporción

en zonas periurbanas, en el macrodistrito La Periférica, en la ciudad de La Paz, a 3700 metros sobre el nivel del mar.

El diseño de investigación utilizado fue de tipo descriptivo transversal con componente analítico, la muestra de población estuvo constituida, por madres en etapa de lactancia, de zonas periurbanas de nivel socioeconómico medio-bajo. Fueron seleccionadas de forma no probabilística, por conveniencia.

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Biología Atómica de la Unidad de Crecimiento y Desarrollo (UCREDE), del Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo (IINSAD). Se evaluaron 43 muestras de leche materna fresca y 43 muestras de leche congelada entre -8 a -20°C. Las muestras que fueron incluidas eran de leche materna fresca, de la mañana, tarde, noche y de ellas se generó una muestra mixta, de madres que daban seno materno en menores de 2 años, siendo la leche materna recolectada, congelada, alícuotada y codificada. Se excluyeron muestras contaminadas, muestras de leche materna que no cumplieron los criterios de conservación, y muestras de leche materna con codificación borrosa o no identificada.

Previo al inicio del estudio se ha obtenido el aval ético del Comité de Ética en Investigación, CEI-IINSAD.

Procedimientos y Técnicas

Se realizó la determinación del crematocrito en las 43 muestras de leche materna fresca y congelada provenientes de las mismas madres.

Las muestras se recolectaron en frascos de plástico estériles (Nalgene), de boca ancha con capacidad de 60 mL (2 onzas), con tapa de rosca. La cantidad recolectada fue de 5 mL de volumen, siendo clasificadas, alícuotadas, y conservadas debidamente.

Las muestras de leche fresca fueron analizadas por la técnica del crematocrito inmediatamente. Muestras leche nocturna y mixta fueron congeladas entre -8 a -20°C (n=43), por un período de tiempo con límites de 96 a 821 días.

El crematocrito fue analizado mediante la técnica de Lucas.¹² Todas las determinaciones

de la mañana, tarde, noche y mixtas, se realizaron por triplicado. La descongelación fue realizada a través del tratamiento térmico de las muestras, mediante baño maría (Sigma-Techware) a 40°C, durante 30 minutos; para inactivar los microorganismos patógenos, se homogenizó con un agitador (Vortex). La cuantificación del crematocrito se realizó en 3 tubos capilares por cada muestra, de 75 microlitros, sin anticoagulante, posteriormente se procedió al sellado de uno de los extremos del tubo capilar con Leicacristoseal; centrifugándose a 10.000 r.p.m., durante 15 minutos (Centrifuga Rolco CH24) para microhematocrito.

La lectura del sobrenadante, analizando la proporción de crema, se realizó mediante un equipo visor de lectura con luz blanca, de tipo circular, (Behring, Hoechst, Francia), con una escala milimetrada (Behring, Francia), con una precisión de 0.5 mm. El crematocrito fue expresado como el porcentaje de crema en relación a la longitud total de la columna de la leche. Se realizó la lectura de los tres crematocritos de cada muestra de leche, obteniéndose el promedio de los mismos, aplicándose la fórmula de Lucas para determinar el contenido de grasa y el contenido de energía.

$$\text{Crematocrito} = a / a+b * 100 = \% \text{ crema}$$

Para la obtención del contenido de grasa se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido grasa} = (\% \text{ crema} - 0.59) / 0.146 = \text{g/L}$$

Para la obtención del contenido calórico se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido calórico} = (\% \text{ de crema} \times 66,8 + 290) = \text{kcal/L}$$

Durante la recolección de la leche se realizó un cuestionario de datos a la madre, incluyendo fecha de extracción, volumen, y características de la leche, previo consentimiento informado. Todos los tubos capilares procesados fueron descartados, con medidas de seguridad.

Tratamiento Estadístico

Los datos fueron introducidos en la plataforma de Microsoft Excel 2013, posteriormente se realizó el control de calidad mediante el método de rango intercuartílico. Los resultados se analizaron a través de la estadística descriptiva, usando la media aritmética, la desviación estándar, frecuencias y porcentajes. Las diferencias entre muestras frescas y congeladas se verificaron a través del test "t" Student para muestras relacionadas. Otras diferencias se verificaron a través del test "t" para muestras independientes. También se realizaron correlaciones. En todo el análisis estadístico, se adoptó una $p < 0.05$. Se utilizaron software estadísticos como el SPSS, versión 17.0.

RESULTADOS

De las 43 muestras de leche materna estudiadas, se midió con precisión el volumen de leche y agua de otras fuentes que no sean de leche materna, que el lactante consumió por día, a través del principio fisiológico de dilución isotópica, con la técnica de la dosis aportada a la madre, utilizando el isótopo estable Deuterio (^2H). El volumen de leche materna en promedio de toda la muestra fue de 740 mL/día.

La grasa de la leche, fue medida a través de la técnica del crematocrito, con muestras de leche materna fresca y congelada (obtenidas en la noche y una mixta de la mañana, tarde y noche).

En el análisis, se ha dividido las muestras acorde al grupo etéreo, en lactantes menores y mayores de 6 meses de edad.

Se realizó la prueba de "t" de student, donde no existen diferencias estadísticas significativas en el crematocrito (%), ni en la grasa de la leche (g/dL), ni en el aporte calórico (kcal/L) de la leche materna en estos dos grupos etéreos (Cuadro 1).

Cuadro N° 1

Características del Crematocrito de la Leche Materna Fresca y Congelada, por Grupo de Edad.

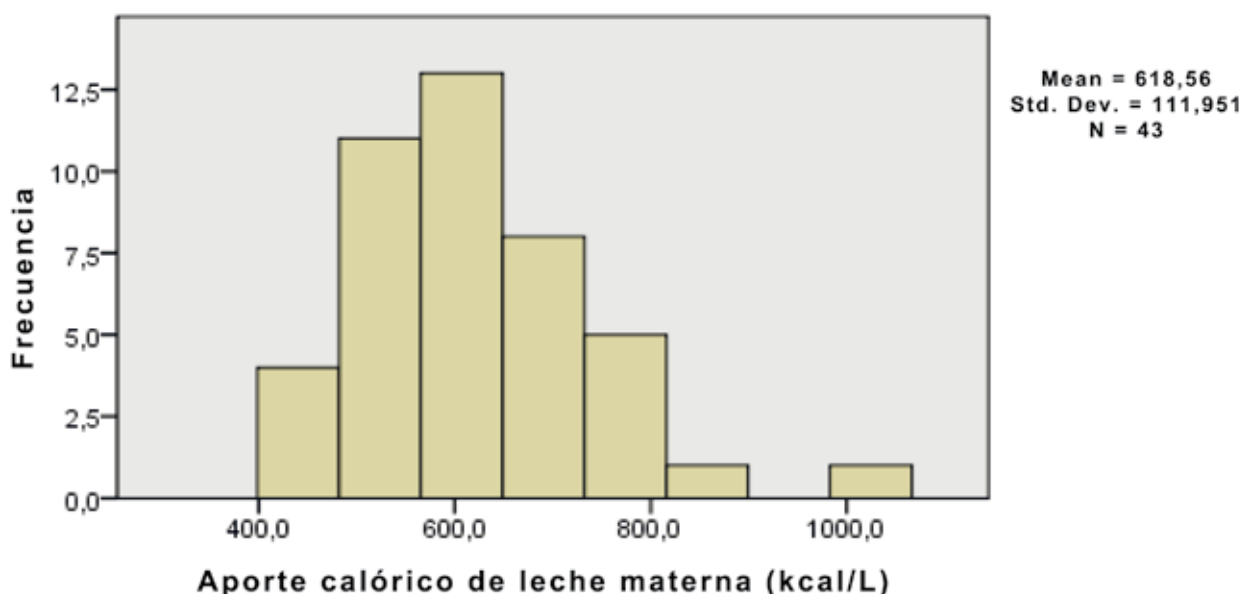
	Total n=43		Grupo etáreo			
			< 6 meses n=31		> 6 meses n=12	
Muestras frescas:	X	DS	X	DS	X	DS
Crematocrito (%)	4.9	1.7	4.8	1.7	5.3	1.6
Grasa de la leche (g/dL)	3.0	1.1	2.9	1.2	3.2	1.1
Energía de la leche (Kcal/L)	618.6	112.0	610.0	115.0	640.7	105.1
Muestras congeladas:						
Crematocrito (%)	3.6	1.4	3.5	1.2	3.7	1.6
Grasa de la leche (g/dL)	2.0	0.9	2.0	0.9	2.2	1.1
Energía de la leche (kcal/L)	528.3	90.3	523.8	83.2	539.8	109.7

Valores expresados en promedio (X), y en desvío estándar (DS).

El promedio del aporte calórico de la leche la distribución de la misma la mostrada en el materna fresca es de $618,6 \pm 112$ kcal/L., siendo gráfico 1.

Gráfico N° 1.

Aporte Energético de la Leche Materna (kcal/L) en Lactantes (n=43)



Cambios de la Grasa, y Aporte Energético de las Muestras de Leche Materna Fresca Frente a la Congelada.

Los valores de las muestras de leche materna en su estado fresco vs. las muestras congeladas, tuvieron un periodo de 96 a 821 días como tiempos límites de congelación. El valor de la grasa post-congelación en la totalidad (n=43) en promedio es de 2,0 (g/dL), y el aporte de energía

es de 528 (kcal/L), siendo ambos menores a los encontrados en la leche fresca. A través de la prueba de "t" de Student, se demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas en estas variables. Así mismo, se observó que la diferencia es de 90 kcal/L, representando el 14.5 % del total de energía que en principio tenía la leche fresca, conservando por lo tanto el 85.5 % de energía post congelación. Cuadro 2.

Cuadro N° 2**Características de leche fresca frente a la congelada, en grasa y contenido energético.**

	Fresca n=43	Congelada	Diferencia
Grasa (g/dL)	2.9 ± 1.1	2.0 ± 0.9	0.9
	p < 0.000		
Contenido energético (kcal/L)	618.5 ± 111	528.2 ± 90	90
	p < 0.000		

Valores presentados en promedio ± desvío estándar, p significativa < 0.05.

Las 43 muestras estudiadas, fueron obtenidas progresivamente desde el segundo semestre del año 2013, ambos semestres del año 2014 y por último el primer semestre del año 2015. En la gestión 2014, se obtuvo la mayor representación de muestras con (48.8%), el 2013 con (41,9%), el 2015 con (9,3%).

En el cuadro 3, se ha desagregado estos períodos de tiempo en que las muestras permanecieron congeladas, comparándose el número de muestras en estado fresco y el mismo número cuando fueron descongeladas para su evaluación en el contenido de grasa y kilocalorías que todavía mantenían.

Se observa que a mayor cantidad de tiempo de estar congeladas, mayores son las diferencias estadísticamente significativas, siendo el máximo de 821 días de congelación. Así mismo las muestras del año 2015, aunque fueron en bajo número (4 muestras), tenían un promedio de 195 días de congelación, y un valor mínimo de 95 días, en las mismas no existieron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de grasa y de energía, aunque han pasado en promedio 6.5 meses de tiempo de congelación

Cuadro N° 3**Comparación del Contenido de Grasa y de Energía, Desagregado por la Cantidad de Tiempo que se han Mantenido las Muestras en Congelación entre -8 a -20 °C**

	Fresca	2do. Sem-2013	Fresca	1er. Sem-2014	Fresca	2do. Sem-2014	Fresca	1er. Sem-2015
	n=18		n=12		n=9		n=4	
Grasa (g/dL)	2.5 ± 0.7	1.8 ± 0.6	3.3 ± 1.5	2.1 ± 0.9	3.3 ± 0.9	2.2 ± 1.2	2.5 ± 1	2.2 ± 1.1
	p < 0.000		p < 0.002		p < 0.009		P < 0.19	
Contenido energía (kcal/L)	581.3 ± 73	507.1 ± 62	657 ± 155	534.9 ± 93	659.2 ± 93	550.7 ± 124	578 ± 106	553 ± 115
	p < 0.000		p < 0.002		p < 0.009		P < 0.19	

Valores presentados en promedio ± desvío estándar y el uso del test "t", p significativa < 0.05.

En el cuadro 4, se describe la cantidad de tiempo de congelación de las muestras de leche materna entre -8 a -20 °C.

Cuadro N° 4**Descripción de Muestras de Leche Materna por la Cantidad de Tiempo de Congelación en Días (n=43)**

Variables	N	X	DS	Max	Min
2do semestre 2013 (días)	18	779	33	821	716
1er semestre 2014 (días)	12	534	41	645	485
2do semestre 2014 (días)	9	361	29	401	331
1er semestre 2015 (días)	4	195	66	233	96

La correlación encontrada con la "r" de Pearson, entre la grasa y las kcal, en muestras de leche

fresca es del 1.0, con una p = 0.000. Entre muestras de leche fresca y congeladas en relación a las kcal es de 0.686, con una p = 0.000. La relación entre fresca y congelada de grasa, también es de 0.686, con una p = 0.000.

DISCUSIÓN

El resultado del estudio muestra una reducción en el contenido de grasa y energía medido por el método del crematocrito en muestras de leche materna congelada frente a muestras de leche fresca, en períodos de tiempo de congelación, a temperaturas entre -8 a -20 °C. Esta reducción fue estadísticamente significativa en los tres primeros semestres del estudio en la leche congelada, no siendo estadísticamente significativa en el último semestre de 2015. Este estudio, es uno de los primeros realizados en leche materna de

poblaciones de gran altitud.

La diferencia de 90 kcal, en las 43 muestras, en la leche congelada, indica que muestras descongeladas de leche materna, tras períodos prolongados de conservación, pueden preservar un aporte de alrededor del 85 % de contenido calórico de la leche fresca en nuestro contexto. Así mismo, se ha encontrado correlaciones fuertes en el contenido de grasa y energía entre muestras frescas y congeladas.

Acorde a la fisiología de altura, se ha indicado que el metabolismo basal y el gasto energético en sujetos residentes de gran altitud estaría incrementado.^{13,14} San Miguel y col. (2002) demostraron en niños escolares nacidos y residentes permanentes de gran altitud (La Paz), con edades de 8 a 9 años de edad, presentaron un consumo de oxígeno (VO_2) incrementado en relación a niños escolares de altitud a nivel del mar (Santa Cruz), siendo los valores encontrados de VO_2 de 184 mL/min, vs. 153 mL/min, respectivamente.¹⁵

El consumo de energía en lactantes de gran altitud, aún no ha sido estudiado.

A nivel del mar, el contenido de energía de la leche materna madura es de 747 kcal/L, con límites experimentales de 446 a 1192 kcal/L.¹⁶

Un estudio realizado sobre consumo de leche materna en la población de niños Otomi, de zona rural, Capulhuac, México, a una altitud de alrededor de 2800 metros de altitud, en lactantes de 4 a 6 meses de edad, utilizó la técnica de dosis a la madre, con el uso de óxido de deuterio, logrando una medición precisa del volumen de consumo de leche materna, obtuvieron como resultado 869mL/día. También evaluaron el contenido de energía de la leche materna mediante bomba calorimétrica,

con valores promedio de energía de 530 kcal/L, y contenido promedio graso de 2.1 g/dL, los autores consideraron a estos dos últimos valores como anormalmente bajos.¹⁷

Los resultados del presente estudio, también muestran valores de contenido de energía bajos en relación a los valores estándar del nivel del mar. En relación a los valores de Butte y col, los niños Otomi, tienen valores de contenido de energía más bajos que los lactantes de nuestro contexto de gran altitud.

Es evidente que tanto el volumen, como la energía estudiados en los niños Otomi, se ha utilizado tecnología mucho más precisa. El presente estudio a gran altitud, ha utilizado el método de dilución isotópica, para lograr una medición precisa del volumen de consumo de leche materna en 24 horas, sin embargo el método del crematocrito es más simple que una bomba calorimétrica para evaluar la energía de la leche materna. Aún con estas limitantes, se puede aportar información que al momento no se cuenta en poblaciones de gran altitud, para evaluar de mejor manera el aporte de energía en nuestros lactantes.

Para el caso de los bancos de leche materna a gran altitud, la información aportada puede mejorar las opciones de preservar muestras de leche materna por tiempos prolongados, conociendo una estimación del porcentaje de pérdida de grasa y energía debida proceso de congelación y tiempo de conservación de muestras de leche materna.

AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento al Centro Cultural y Popular (CCP), por su cooperación y desprendimiento demostrados en el apoyo con el reclutamiento de las madres del presente estudio.

REFERENCIAS

1. Sabillon F, Abdu B. *Composicion de la leche materna. HondPed.* 1997;18(4):120-124.
2. Shelhorn C, Valdes V. *La leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche de vaca. Chile:Comision de lactancia MINSAL, UNICEF; 1995 [Citado el 15 de agosto de 2015] Disponible en:*
3. Lonnerdal B. *Nutritional and physiological significance of human milk proteins. Am J ClinNutri* 2003;77:1537S-1543.
4. *Organización Mundial de la Salud. Modalidades de la lactancia natural en la actualidad. Ginebra: OMS; 1981.*
5. DiazArchilla S. *Evaluación de resultados de la implementación del banco de leche humana del 2005 al 2013. Estudio realizado en el Hospital Nacional Pedro de Betancourth, San Felipe de Jesús, antigua Guatemala, 2014 [Tesis licenciatura]. Quetzalquenago: Universidad Rafael Landivar; 2014.*
6. *La Paz alberga el primer Banco de Leche Materna en Bolivia. Pagina siete. 2014 Abr10.*
7. Lopez M, Blanes M, Herrera M, Mora C. *Estudio de la calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche humana colectada por el banco de leche del hospital materno infantil san pablo. Asuncion (PA): Fac de Ciencias Químicas; Universidad Nacional de Asunción.*
8. Oribea M, Lertxundía A, Basterrecheaa M, Bergiritaina H, Santa Marina L, y col. *Prevalencia y factores asociados con la duración de la lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses en la cohorte INMA de Guipúzcoa. GacSanit.* 2015; 29 (1): 4-9
9. *Ministerio de Salud y deportes. Encuesta Nacional de Demografía y salud. Bolivia; 2008.*
10. *Asociación española de bancos de leche humana. Datos de actividad de todos los bancos de leche españoles. España: AEBLH; 2014.*
11. Mayans E, Martell M. *Estimación del valor calórico de la leche materna mediante la técnica del crematocrito. RevMed Uruguay* 1994;10:160-164.
12. Lucas A, Gibbs JAH, Lyster RLJ, Baum JD. *Crematocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. Br Med J* 1978;1:1018-20.
13. Grover RF. *Basal oxygen uptake in man at high altitude. J Appl Physiol* 1963;18:909-912.
14. Gill MB, Pugh LGCE. *Basal metabolism and respiration in men living at 5.800 m (19.000 ft). J Appl Physiol* 1964;19:949-954.
15. San Miguel JL, Spielvogel H, Berger J, Araoz M, Lujan C, Tellez W, Caceres E, Gachon P, Coudert J, Beaufre B. *Effect of high altitude on protein metabolism in Bolivian children. High AltitudeMedecine&Biology* 2002, 3: 377-386.
16. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. *Tratado de pediatría. 16ta. ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana. 2000.*
17. Butte NF, Villalpando S, Wong WW, et. Al. *Human milk intake and growth faltering of rural Mesoamerindian infants. Am J ClinNutr* 1992;55:1109-16.