

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00175
Matrícula: 2153803628

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
LA LECHE MATERNA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 9 del mes de marzo del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO
Q.B.P. SARAI VASTI QUINTANA MILPAS
M. EN C. LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ

siendo las dos primeras asesoras del alumno y lectora la tercera, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

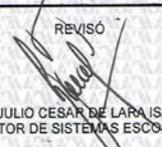
ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: JESUS VICTOR BAEZA RUIZ

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS


DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

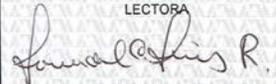
ASESORA


DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO

ASESORA


Q.B.P. SARAI VASTI QUINTANA MILPAS

LECTORA


M. EN C. LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Iztapalapa

Ciencias Biológicas y de la Salud

Especialidad en Biotecnología

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA LECHE MATERNA”

Tesis que presenta

Biól. BAEZA RUIZ JESUS VICTOR

Directora

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero.

Asesor

QBP. Sarai Vasti Quintana Milpas

Sinodal

M.C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz

México, D.F. Febrero 2017

CONTENIDO

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

2. ANTECEDENTES

2.1 LECHE MATERNA

2.2 COMPOSICIÓN Y FACTORES BIOACTIVOS DE LA LECHE HUMANA

2.2.1 INMUNOGLOBULINAS

2.2.2 LACTOFERRINA

2.2.3 OLIGOSACARIDOS EN LECHE MATERNA

2.2.4 PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA LECHE MATERNA

2.2.5 BANCOS DE LECHE MATERNA

2.2.6 ESTUDIOS DEL ALMACENAMIENTO DE LECHE MATERNA

3. JUSTIFICACIÓN

4. HIPOTESIS

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

6. METODOLOGÍA

6.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS

6.2 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA LECHE MATERNA

6.3 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA LECHE MATERNA HIDROLIZADA

6.4 CRECIMIENTO EN PLACA

7. RESULTADOS

7.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA LECHE HUMANA REFRIGERADA

7.2 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA LECHE HUMANA CONGELADA

7.3 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA LECHE HUMANA PASTEURIZADA

7.4 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA LECHE HUMANA HIDROLIZADA

8. CONCLUSIONES

9. BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

La leche materna contiene diversos constituyentes que llevan a cabo una doble función, no solamente como elementos nutricionales sino también como factores de protección frente a infecciones, inmunitarios o de otro tipo. En los bancos de leche humana se realizan procesos de recolección, procesamiento y distribución de leche materna con calidad certificada para los recién nacidos que se encuentran hospitalizados. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto antibacteriano de la leche materna, después de haber sido sometida a diferentes procesos de conservación, en pruebas *in vitro* contra *Escherichia coli*, aislada de un hemocultivo de un neonato que presentaba sepsis. Se observó que en todos los casos, la leche materna tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Escherichia coli*. El grado de inhibición fue diferente en cada tratamiento. La inhibición en el crecimiento de *E. coli* en la leche refrigerada fue de 91 y 97% de inhibición en calostro y leche de transición respectivamente, mientras que en la leche madura fue de 50%. Por otra parte, en las leches conservadas en congelación observamos 60% de inhibición del crecimiento de *E. coli* en los tres tipos de leche. Finalmente, con la pasteurización se observó 90 y 99% de inhibición en el crecimiento de *E. coli* en calostro y leche madura respectivamente, mientras que en leche de transición fue de 70%. Con estos resultados comprobamos que la leche materna conserva su actividad antibacteriana contra *E. coli* después de ser sometida a distintos métodos de almacenamiento. Lo cual es muy importante porque provee de información relevante que puede ser utilizada en los bancos de leche materna de los hospitales infantiles en nuestro país.

1. INTRODUCCION

La leche materna es una secreción de la glándula mamaria cuya composición es variable, contiene constituyentes nutricionales y factores de protección frente a infecciones neonatales causadas por algunas bacterias, como cepas patógenas de *Escherichia coli*. Los tipos de leche humana, calostro, transición y madura, contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo del neonato. En 2001 la OMS acreditó a los bancos de leche materna como una de las mejores estrategias sanitarias en la disminución de la mortalidad infantil y en la protección de la lactancia por lo que a partir de esa fecha se estableció un programa para fomentar la lactancia materna y crear bancos de leche humana en los hospitales para poder alimentar a los neonatos que estén hospitalizados. Algunos estudios han intentado demostrar la importancia de la administración de la leche materna, porque posee propiedades antibacterianas contra enterobacterias, sumado a que el niño todavía necesita mecanismos de defensa inmunológicos, por lo que es susceptible al espectro de infecciones microbianas. Los estudios varían mucho en la mayoría de los aspectos, tales como la técnica para la recolección de leche, limpieza y tipo de recipientes, duración de almacenamiento, método para descongelar la leche, temperatura y tipo de recipiente en el que se almacena y las técnicas para el cultivo de las muestras de leche. No hay una definición aceptada de lo que es leche insegura, pero otros ensayos describen el grado de contaminación en la leche durante un periodo de tiempo a ciertas temperaturas y condiciones de almacenamiento, típicamente descritas como el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Se habla sobre la capacidad bactericida de la leche humana almacenada, la cual reflejaría su efectividad inmunológica para el neonato y el riesgo de que la leche se contamine durante el tiempo que dure almacenada. El porcentaje de pérdida de la actividad bactericida que haría que la leche humana no sea apta para el consumo no ha sido definida. Por lo anterior se propuso como objetivo del proyecto evaluar el efecto antibacteriano de la leche materna, después de haber sido sometida a diferentes procesos de conservación, en pruebas *in vitro* contra *Escherichia coli*, aislada de un hemocultivo de un neonato con sepsis.

2. ANTECEDENTES

2.1 LECHE MATERNA

La leche humana no es sólo un alimento, es un fluido, capaz de adaptarse a los diferentes requerimientos del niño a lo largo del tiempo (modificando su composición y volumen) y que facilita su adaptación a la vida extrauterina. La leche humana es un líquido producido por la glándula mamaria, de gran complejidad biológica, constituido por nutrientes, sustancias inmunológicas, hormonas, enzimas, factores de crecimiento, células inmunoprotectoras, etc., que la hacen nutricional e inmunológicamente apta para que un niño sea alimentado con ella en forma exclusiva durante los primeros seis meses de vida. La OMS recomienda la alimentación al seno materno hasta los dos años de edad, aun cuando se inicie la alimentación complementaria, pues la leche materna ofrece grandes beneficios. Capacitar al personal de salud acerca de sus beneficios, incrementará el apoyo y fomentará este alimento en los lactantes. Los diferentes tipos de leche que se producen en la glándula mamaria son calostro, leche de transición y leche madura (1,2).

A pesar de la evidencia que apoya el efecto protector de la leche materna en la prevención de enfermedades y la mortalidad general, las tasas de lactancia materna están por debajo de las recomendaciones de la OMS en muchos países en desarrollo (4).

Aunque la composición nutricional de la leche artificial se ha mejorado de forma continua, muchos estudios muestran que todavía hay diferencias considerables entre los niños amamantados y los alimentados con fórmula, tales como los patrones de crecimiento, estado nutricional, la prevalencia de infecciones, la microbiota intestinal, etc. Hay muchos factores que son responsables de estas diferencias, pero es probable que varios tipos de proteínas bioactivas presentes en la leche humana estén contribuyendo a estos resultados tanto a corto como a largo plazo (9).

TIPOS DE LECHE

De acuerdo a su composición y tiempo en la cual se produce la leche materna se considera el momento del nacimiento como el día uno de producción láctea (12).

La leche materna sufre modificaciones en los elementos que la integran en diferentes etapas de la lactancia dando lugar a los diferentes tipos de leche que se producen en la glándula mamaria que son calostro, leche de transición y leche madura (1,2).

CALOSTRO

Se secreta de 1 a 7 días después del parto, fluido de color amarillento por la presencia de β -carotenos. Su volumen puede variar de 2 a 20 ml/ día, suficiente para satisfacer las necesidades del recién nacido. Tiene un contenido muy elevado en inmunoglobulinas especialmente IgA, lactoferrina, células (linfocitos y macrófagos), oligosacáridos, citoquinas y otros factores defensivos. En concentraciones menores a los componentes anteriormente mencionados se encuentran las grasas, la lactosa y las vitaminas hidrosolubles. El calostro protege contra infecciones ya que se transfiere inmunidad pasiva al recién nacido por absorción intestinal de inmunoglobulinas, además contiene linfocitos y altas concentraciones de lisozima (1,2).

TRANSICIÓN

Esta leche se produce entre el 7 y 15 día postparto, progresivamente se eleva sus concentraciones de lactosa, grasa, colesterol, fosfolípidos y vitaminas hidrosolubles; mientras que disminuyen las proteínas, las inmunoglobulinas y las vitaminas liposolubles debido a que se diluyen por el incremento en el volumen de producción de la leche, que puede alcanzar 660 ml/día. Su color blanco se debe a la emulsificación de grasas y a la presencia de caseinato de calcio. Esta leche es de composición intermedia y va variando día a día hasta alcanzar la composición de la leche madura (1,2).

MADURA

La leche madura comienza su producción a partir del 16 día postparto y puede continuar por más de 15 meses. Su volumen promedio es de 750 ml/día, pero puede llegar hasta 1,200 ml/día en madres con embarazo múltiples.

Tiene una gran variedad de componentes nutritivos y factores bioactivos. El agua representa el 87% del total de sus componentes, aporta 670 a 700 kcal/l en su mayoría a través de los carbohidratos y las grasas (1,2).

2.2 COMPOSICIÓN Y FACTORES BIOACTIVOS DE LA LECHE HUMANA

Múltiples factores inmunológicos producidos por los sistemas inmunes innatos y adquiridos de la madre son transportados al neonato a través de la leche materna. Además de los carbohidratos, proteínas y lípidos, la leche humana tiene células, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, hormonas y bacterias. Muchos de estos factores se han asociado con una función protectora contra las infecciones en los niños, incluyendo oligosacáridos, glicoconjugados, inmunoglobulinas secretoras, lactoferrina, α -lactoalbúmina, lisozima, mucinas y microbiota bacteriana (4).

Estos compuestos bioactivos son considerados nutrientes potencialmente esenciales con importantes actividades bioquímicas y fisiológicas de gran importancia por sus factores de defensa contra antígenos y agentes patógenos. (3)

La leche materna es un complejo fluido biológico, contiene toda una serie de compuestos bioactivos como enzimas, hormonas, factores de crecimiento, proteínas específicas, nucleótidos, oligosacáridos, etc., que ejercen efectos biológicos y que en conjunto reciben el nombre de “factores tróficos de la leche” (3).

La leche materna se compone por una serie de nutrientes y elementos que caracterizan los mecanismos de defensa de la misma (Tabla 1) (13).

Nutrientes/100 ml	Calostro	Transición	Madura
AGUA	88,2 g	87,4 g	87,1 g
ENERGÍA	56 Kcal	67 Kcal	69 Kcal
PROTEÍNAS	2 g	1,5 g	1,3 g
LÍPIDOS	2,6 g	3,7 g	4,1 g
CARBOHIDRATOS	6,6 g	6,9 g	7,2 g
NITRÓGENO TOTAL	0,31 g	0,23 g	0,20 g
AG SATURADOS	1,1 g	1,5 g	1,8 g
AGM	1,1 g	1,5 g	1,6 g
AGP	0,3 g	0,5 g	0,5 g
COLESTEROL	31 mg	24 mg	16 mg
RETINOL	155 µg	85 µg	58 µg
CAROTENO	135 µg	37 µg	24 µg
VITAMINA E	1,30 mg	0,48 mg	0,34 mg
TIAMINA	0,01 mg	0,01 mg	0,02 mg
RIBOFLAVINA	0,03 mg	0,03 mg	0,03 mg
NIACINA	0,1 mg	0,1 mg	0,2 mg
FOLATO	2 µg	3 µg	5 µg
PANTOTENATO	0,12 mg	0,20 mg	0,25 mg
BIOTINA	0,2 µg	0,2 µg	0,7 µg
VITAMINA C	7 mg	6 mg	4 mg

Tabla 1. Composición media de nutrientes en calostro, leche de transición y leche madura. Sager G. 2009.

Se ha encontrado en la leche materna diferentes clases de inmunoglobulinas, la mayor concentración se encuentra en el calostro, estos anticuerpos se adhieren a la superficie del intestino delgado y actúan como una barrera contra enterobacterias (15).

2.2.1 INMUNOGLOBULINAS

Entre las inmunoglobulinas que están presentes en la leche materna, destacan:

1. **IgG.** De todas las inmunoglobulinas ésta es la que se encuentra en mayores concentraciones en el calostro, estimula la fagocitosis contra bacterias.
2. **IgM.** Es considerada como una macroglobulina, generalmente aparece en respuestas primarias, estimula la fagocitosis contra bacterias e impide su absorción.
3. **IgA.** Está presente en la mucosadigestiva e intestinal, por lo que se considera como una defensa contra bacterias y otros microorganismos.

La leche materna contiene factores humorales tanto específicos como inespecíficos que protegen contra agentes infecciosos. Tiene acción protectora contra agentes bacterianos en los primeros años de vida, como: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella sp.*, *Clostridium difficile*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus sp. etc.* (15).

Entre los componentes inmunológicos de la leche materna, están: Linfocitos B y T, inmunoglobulinas que inhiben la colonización de las bacterias en el tracto gastrointestinal (15).

2.2.2 LACTOFERRINA

Es uno de los componentes más importantes de las proteínas de la leche materna, constituyendo alrededor del 10-15% de las mismas. El calostro contiene 2-3% y en leche madura desciende a 1-1,5%. Es una glicoproteína ligada a hierro con propiedades antimicrobianas múltiples, antiinflamatorias e inmunomoduladoras. La actividad antimicrobiana está relacionada con su capacidad de secuestrar el hierro que es esencial para el crecimiento bacteriano y que produce alteraciones en la membrana bacteriana que conducirían a la pérdida de su integridad y por tanto su muerte (3).

Se ha demostrado que la lactoferrina podría liberar lipopolisacáridos de las membranas celulares de las bacterias Gram (-), y también, podría unirse a un grupo de moléculas llamadas porinas induciendo cambios en la permeabilidad de la membrana, mediante estimulación de la fagocitosis por macrófagos y monocitos (3).

Esta capacidad antimicrobiana no es exclusiva de la lactoferrina integra, sino que se ha demostrado la existencia de derivados procedentes de la digestión. Este efecto ha sido documentado *in vitro* para *Shigella*, *Salmonella*, *E.coli* enteropatógena y enteroagregativa, así como algunos virus entéricos (rotavirus, calicivirus) y parásitos (*Giardia*, *Entamoeba histolytica*) (3,4).

Esta proteína posee la capacidad de resistir a la proteólisis, específicamente en su forma saturada con hierro, por tanto, puede resistir en el intestino del lactante la acción de las enzimas pancreáticas y pepsina. A partir del conocimiento de que una parte significativa del hierro en la leche materna va unida a la lactoferrina, se ha formulado la hipótesis de que la lactoferrina podría favorecer la absorción de hierro en los lactantes alimentados con leche humana (3).

La molécula de la lactoferrina brinda protección contra las infecciones bacterianas mediante mecanismos directos e indirectos. Los primeros comprenden a las actividades bacteriostáticas y bactericidas, mientras que los mecanismos indirectos se basan en la prevención de la adherencia de los patógenos a las células eucariotas y en la modulación del sistema inmune (5).

En 1992, Bellamy *et al.* identificaron una porción de aminoácidos del extremo aminoterminal de la lactoferrina, que retiene su actividad biológica cuando se aísla del resto de la molécula. Esta porción denominada lactoferricina, se libera de manera natural en el organismo, debido a la acción de la pepsina gástrica. Se ha demostrado que este péptido se une al lipopolisacárido a través de algunos de sus aminoácidos catiónicos (5).

Es importante hacer notar que la actividad antimicrobiana de la lactoferricina es mayor que la de la molécula nativa de lactoferrina. También se ha observado un aumento en la actividad antimicrobiana, al modificar químicamente a los péptidos de lactoferrina, aumentando sus cargas positivas. Es probable que la lactoferricina tenga un efecto bactericida mayor que el de la lactoferrina, debido a su tamaño, ya que al ser más pequeña que ésta, no presenta un efecto estérico sobre la superficie bacteriana pudiendo introducirse fácilmente, actuando directamente sobre la membrana interna (Figura.1) (5).

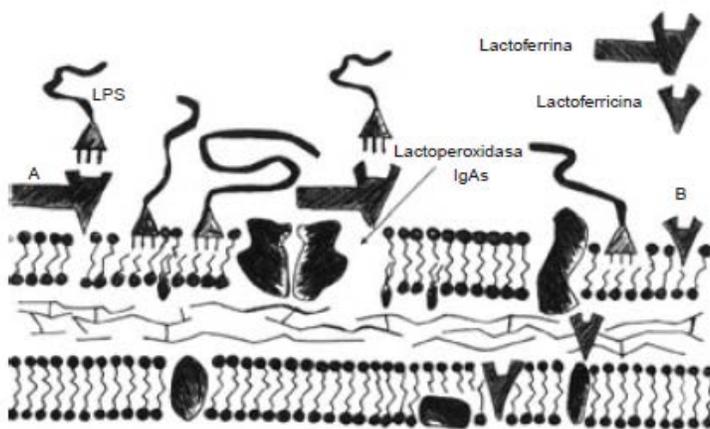


Figura 1. Modelo del mecanismo de la acción antimicrobiana de la lactoferrina (A) y la lactoferricina (B) en la superficie celular de las bacterias Gram negativas. La lactoferrina y la lactoferricina se unen a la pared celular causando la liberación del lipopolisacárido y alterando su permeabilidad. Esta alteración facilita la acción de la lactoperoxidasa y otras proteínas de defensa, sobre la bacteria. La lactoferrina queda unida a la pared celular, mientras la lactoferricina, de menor tamaño, puede penetrar hasta la membrana, provocando un mayor daño en el microorganismo. Rodríguez F; *et al.* (2005).

2.2.3 OLIGOSACARIDOS EN LECHE MATERNA

Los oligosacáridos de la leche materna son carbohidratos que tienen lactosa en el extremo reductor y fucosa o ácido siálico en el extremo no reductor. Pueden encontrarse como oligosacáridos libres o formando parte de algunos glicoconjugados unidos a lípidos, o a proteínas, sus estructuras se componen principalmente por:

- D-glucosa
- D-galactosa
- N-acetilglucosamida
- L-fucosa
- Ácido siálico (N-acetilneuroamínico)

El contenido de oligosacáridos libres en leche materna madura es de 9-12 g/l, y llegan a ser de 15-23 g/l en el calostro. Los dos principales efectos demostrados de los oligosacáridos de la leche materna son antiinfeccioso y bifidogénico. Estudios *in vitro* han demostrado que los oligosacáridos de la leche materna tienen una estructura semejante a la de los receptores específicos de bacterias, toxinas y virus, de modo que actúan como receptores competitivos en las células intestinales de superficie del huésped, previniendo la adhesión de patógenos. Otros estudios demostraron que algunos oligosacáridos de la leche materna resisten la digestión (6,8).

Durante el primer año de vida los lactantes necesitan una protección adicional frente a patógenos, debido a la inmadurez de su sistema inmune porque presentan un pH gástrico mayor. Los oligosacáridos ejercen un efecto antiinfeccioso a través de dos mecanismos: inhibiendo la colonización y el crecimiento de patógenos, ya que actúan como análogos de los receptores celulares y ejerciendo un efecto prebiótico, es decir favoreciendo el desarrollo de algunas bacterias beneficiosas para el neonato (7).

Existe evidencia de que los oligosacáridos de la leche materna pueden absorberse parcialmente, permaneciendo en el torrente sanguíneo pudiendo inducir algunos efectos sistémicos. Algunos estudios muestran que mediante este reconocimiento del tipo lectina-carbohidrato, los oligosacáridos de la leche materna son capaces de modular la adhesión de leucocitos, monocitos, linfocitos y neutrófilos, ejerciendo un efecto antiinflamatorio que posiblemente contribuya a la disminución de la incidencia de enfermedades inflamatorias en el infante (8).

El efecto antiinfeccioso de los oligosacáridos de la leche materna (Figura 2) (8) se relaciona con su acción sobre la microbiota intestinal benéfica del hospedador. Es decir, con el soporte en el crecimiento de Lactobacilos y Bifidobacterias, que permitan excluir a los patógenos del tracto gastrointestinal a través de:

- La competencia por sitios de adhesión en la mucosa.
- Disminución de pH, debido a la producción de los ácidos grasos de cadena corta.
- La producción de sustancias inhibitoras como las bacteriocinas.

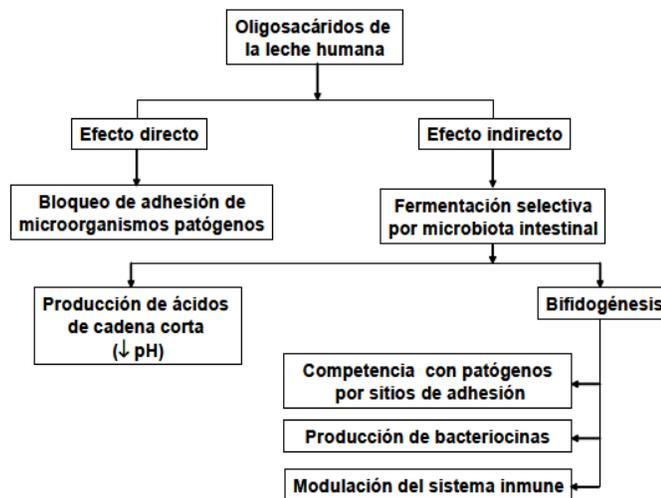


Figura 2. Efecto protector de los oligosacáridos de la leche materna contra infecciones microbianas. Domínguez A; *et al.* (2009)

Una acción más específica y directa de los oligosacáridos de la leche materna, para prevenir infecciones, es su capacidad de actuar como análogos solubles de los receptores del tracto gastrointestinal, a los que se unen, varios microorganismos Gram negativos. En la (Figura 3) se muestra el modelo de la protección de los oligosacáridos de la leche materna contra infecciones. Hay más de 20 oligosacáridos en la leche materna capaces de unirse competitivamente a patógenos del tracto intestinal, respiratorio y urinario, reportando que dichos microorganismos se encuentran menos frecuentemente en los niños alimentados con leche materna. Algunos oligosacáridos fucosilados son capaces de inhibir la adhesión de *E. coli* enteropatogénico a las células epiteliales (7,8).

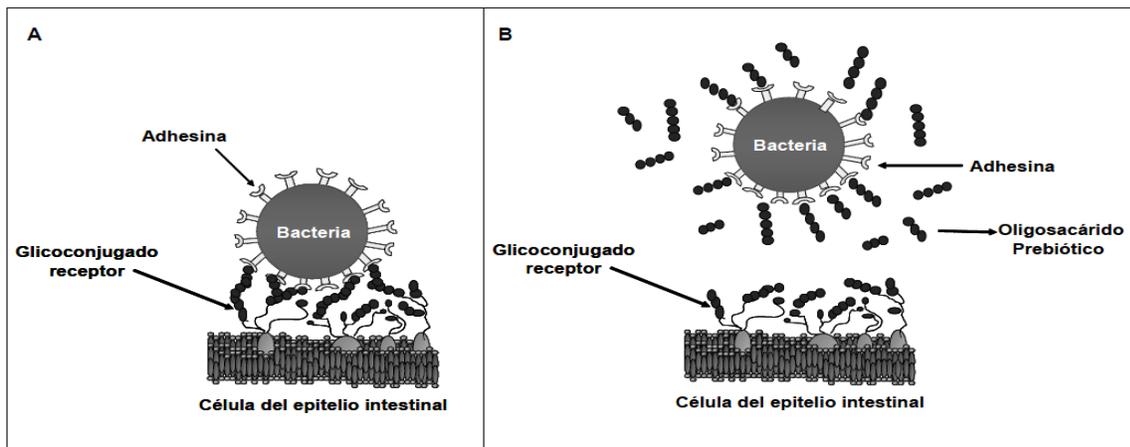


Figura 3. Indica como el oligosacárido es capaz de prevenir la adhesión bacteriana y por tanto la infección. El principio se basa en el reconocimiento proteína-carbohidrato que se establece entre las lectinas microbianas y los glicoconjugados de la superficie celular. Permitiendo a la bacteria adherirse y posteriormente colonizar e invadir al epitelio intestinal, por ejemplo, *E. coli*, *Helicobacter jejuni*, y algunas especies de *Salmonella* y *Shigella*. Domínguez A; *et al.* (2009)

2.2.4 PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA LECHE MATERNA

No sólo las proteínas de la leche materna en su forma activa presentan efectos beneficiosos para el lactante. Muchos péptidos liberados durante la digestión enzimática de proteínas actúan positivamente a muchos niveles. En el lactante, la permeabilidad de la mucosa intestinal es mayor que en el adulto siendo a la vez mayor la resistencia de estos péptidos a la acción proteolítica por lo que pueden atravesar la barrera intestinal y alcanzar la circulación sistémica. La digestión de proteínas se inicia en el estómago. A continuación, se hidrolizan adicionalmente por enzimas pancreáticas tales como la pepsina, la tripsina, la quimotripsina y peptidasas de membrana obteniéndose péptidos de diferentes tamaños. Algunos de los péptidos pueden tener múltiples funciones, y ejercen su actividad directamente en el lumen gastrointestinal. Sin embargo, otros funcionan en órganos periféricos después de ser absorbidos en la mucosa intestinal (posiblemente algunos se digieren aún más durante el curso del transporte por peptidasas del borde en cepillo y peptidasas citoplasmáticas) (9,10).

De entre todos los péptidos presentes en la leche materna destacan aquellos con actividad opiácea, que ejerce su acción sobre el sistema digestivo (Tabla 2) (10).

Los péptidos opioides más estudiados son los derivados de proteínas lácteas (caseínas). Una vez absorbidos, estos péptidos alcanzan la circulación sistémica llegando al cerebro y otros órganos y ejercer actividades farmacológicas similares a la morfina o el opio. Éste puede ser el motivo por el cual los recién nacidos, en general, se calman y tienen sueño después de beber leche. En contraste con las casomorfina, algunos péptidos producidos por la hidrólisis de κ -caseína pueden actuar como antagonistas de los opioides, es decir, que pueden inhibir el efecto de sustancias como la morfina (10).

Pruebas antibacterianas mostraron que los péptidos en leche materna inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Además, si estos péptidos son beneficiosos para el lactante y sobreviven intactos en el tracto digestivo del lactante también deben ser objeto de investigaciones futuras.

La presencia de tales péptidos antimicrobianos en el tracto digestivo podría ser importante en la prevención de infecciones gastrointestinales infantiles, incluyendo enterocolitis necrotizante (20).

Proteína precursora	Fragmento	Nombre	Referencia
β -caseína	60-70	β -casomorfina-11	Meisel, 1986
	60-66	β -casomorfina-7	Kayser et al., 1996
	60-64	β -casomorfina-5	Henschen et al., 1979
α_1 -caseína	90-96	α -caseína exorfina	Loukas et al., 1983
	90-95	α -caseína exorfina	Loukas et al., 1983
	91-96	α -caseína exorfina	Loukas et al., 1983
κ -caseína	33-39	casoxina	Chiba et al., 1989
	25-34	casoxina c	Chiba et al., 1989
α -lactoalbúmina	50-53	α -lactorfina	Mullally et al., 1996
β -lactoglobulina	102-105	β -lactorfina	Antila et al., 1991
albúmina sérica	399-404	serorfina	Tani et al., 1994

Tabla 2. Péptidos bioactivos procedentes de la leche materna, Gómez C; *et al.* (2009)

2.2.5 BANCOS DE LECHE MATERNA

En situaciones donde no se dispone de leche de la propia madre, la leche materna de donadoras es una alternativa válida, como reconoce la Academia Americana de Pediatría. La Organización Mundial de la Salud y la UNICEF, en su estrategia global para la alimentación del lactante y el niño, apoyan conjuntamente la existencia de los bancos de leche humana para promocionar y apoyar la lactancia materna (12).

El banco de leche humana es un servicio especializado, orientado a la promoción y el apoyo a la lactancia materna y es responsable de proporcionar leche materna a los pacientes que la precisen, garantizando su seguridad y calidad. Para ello se encarga de la selección de donadoras, así como del almacenamiento, el procesamiento, el análisis y la distribución de la leche (12).

Existe una normatividad con el objetivo de establecer las condiciones necesarias para el almacenamiento de la leche materna y forma parte del control de calidad en los bancos de leche materna. El primer banco de leche se creó en Viena en 1909. Desde entonces los bancos de leche fueron estableciéndose en numerosos países: Reino Unido, Francia, Italia, Dinamarca, Suecia, Alemania, EEUU, Canadá, Brasil. Durante los años 80 y coincidiendo con la aparición del SIDA y con el desarrollo de fórmulas lácteas para prematuros se produjo el cierre de muchos de estos bancos (11).

Desde hace unos años asistimos a un resurgimiento de la lactancia materna en general y de los Bancos de Leche Materna, en particular, impulsado por estudios que muestran que los recién nacidos prematuros muestran una mejor evolución si son alimentados con leche humana en lugar de fórmula maternizadas. Esto es especialmente evidente en lo que se refiere a una menor tasa de infecciones, un mejor desarrollo psicomotor a largo plazo y una menor tasa de enterocolitis necrotizante (NEC), así como una mejor tolerancia a la introducción de la alimentación enteral (11).

Por otro lado, los estudios de seguimiento hasta la edad escolar y la adolescencia de niños alimentados con leche de banco demuestran un índice normal de crecimiento y de mineralización ósea, así como unas cifras menores de tensión arterial (11).

La leche materna procesada en el Banco de Leche conserva las propiedades nutritivas e inmunológicas que hacen de la leche humana un producto insustituible a la hora de hablar de la alimentación del niño prematuro. Además, se trata de un producto seguro en cuanto al riesgo de transmisión de infecciones. Por una parte, la seguridad frente a la transmisión de infecciones por parte de la donante se consigue gracias al control estricto en la selección de las donantes, a la práctica de serologías en todos los casos y a un proceso de pasteurización de la leche antes de su dispensación (11).

Por otra parte, la seguridad frente al riesgo de contaminación de la leche se consigue gracias al cumplimiento por parte de la donante de una serie de normas de higiene y de instrucciones para la extracción de la leche. Asimismo, esta leche es sometida a estrictos controles microbiológicos antes y después de su procesamiento y es manipulada en todo momento en condiciones estériles, en una campana de flujo laminar (11).

Los bancos de leche realizan procesos de recolección de leche materna, la almacenan y pasteurizan, estos procesos producen una disminución significativa en el número de células y en los niveles de anticuerpos del tipo SigA y lactoferrina, donde la lisozima es estable a la pasteurización tipo Holder (62,5 °C, 30 minutos), se sabe además que en el congelamiento (-20 °C, 6 meses) no interfiere con las proteínas lácteas que son muy importantes para la protección del recién nacido (17).

2.2.6 ESTUDIOS DEL ALMACENAMIENTO DE LECHE MATERNA

Varios estudios han demostrado lo seguro que es refrigerar la leche materna (4°C), ya se ha evaluado la capacidad bactericida de la leche almacenada como marcador para su calidad o midiendo el crecimiento bacteriano en las muestras de leche almacenada. La capacidad bactericida de la leche materna almacenada disminuye significativamente a las 48-72 horas. Sin embargo, otros autores aseguran que la leche materna con muy poca contaminación al tiempo de extracción es segura con niveles bajos de crecimiento bacteriano a las 72 y hasta después de 4-8 días de refrigeración (14).

La leche materna congelada a -20°C ha demostrado ser segura por lo menos 3 meses. Las vitaminas A, E, y B, proteínas totales, grasas, enzimas, lactosa, inmunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, generalmente se preservan cuando se congela la leche materna. Pocos estudios han encontrado una disminución significativa en los niveles de vitamina C en leche materna congelada después de 3 meses (14).

No se encontró que el crecimiento bacteriano fuera un problema en la leche congelada por lo menos en 6 semanas. La actividad antibacteriana de la leche materna congelada se conserva por lo menos 3 semanas. Una vez que la leche congelada llegue a temperatura ambiente, su habilidad de inhibir el crecimiento bacteriano disminuye, especialmente después de 24 horas de ser descongelada (14).

Las evidencias para el almacenamiento de leche materna están basadas en estudios antiguos, pequeños, no reproducibles que son difíciles de comparar. La mayoría varían mucho en aspectos tales como la técnica para la recolección, limpieza y tipo de recipiente, duración de almacenamiento, método para descongelar, temperatura y tipo de recipiente en el que se almacena y las técnicas de cultivo para las muestras de leche (14).

Otros estudios han investigado la capacidad bactericida de la leche materna almacenada, la cual reflejaría su efectividad inmunológica para el neonato y el riesgo de que la leche se contamine durante el tiempo que permanezca almacenada. La pérdida de la actividad antibacteriana haría que la leche materna no sea apta para el consumo no ha sido definido. No hay estudios que hayan investigado la calidad de la leche materna después de 6-12 meses de congelación (14).

Varios procesos de almacenamiento congelación / calentamiento / pasteurización aplicados a la leche humana antes de la entrega a los recién nacidos podrían afectar a la concentración de proteínas inmunomoduladoras, especialmente lactoferrina, inmunoglobulina A secretora, y la lisozima. Se encontró que la leche fresca es el mejor alimento para los recién nacidos. Pero se necesitan más estudios para evaluar la actividad funcional de estas proteínas y sus efectos sobre el estado inmunológico de los neonatos (18).

Se ha evaluado la leche materna, con pasteurizaciones a diferentes temperaturas, la pasteurización a 73°C durante 30 minutos en un banco de leche, encontró muy baja concentración de IgA, IgG, lactoferrina, lisozima. La pasteurización a 62,5°C produjo una pérdida de 23,7% de la lisozima, 56,8% de la lactoferrina 34% de la IgG, pero no pérdida de IgA. El almacenamiento en congelación a -20 °C durante 3 meses no produjo pérdida de la lactoferrina, lisozima, IgG, IgA (16).

Se analizaron las variaciones en la composición proteica de la leche materna madura durante el almacenamiento en congelación. Los resultados del almacenamiento a -20 °C, mostraron una estabilidad química en el contenido de proteínas totales de la leche materna madura, casi idéntica a la obtenida en la leche recién extraída. La concentración proteica fue 1,58 g/dl al inicio y de 1,61 g/dl a los 90 días (19).

Ensayos previos muestran resultados variables en cuanto a modificación en la composición proteica de la leche materna durante el almacenamiento a diferentes temperaturas. Se ha reportado que puede ocurrir proteólisis durante la refrigeración, mientras que en la congelación no suceden estos cambios; la leche congelada ha reflejado similitudes a la de la leche fresca (19).

Peila *et al.* 2016 (21) estudiaron el efecto del tratamiento térmico en los componentes principales de la leche materna, reportando que existe una disminución significativa de proteínas, sacáridos, vitaminas, etc., confirmando la gran preocupación que existe sobre la pasteurización de leche materna y la necesidad de futuras estrategias para prevenir o limitar la degradación de proteínas, con el fin de comprender los efectos reales de la pasteurización.

La leche materna pasteurizada es conocida por tener efectos benéficos y protectores, se cree que este método conduce a un buen compromiso entre la seguridad microbiológica y la calidad nutricional. Sin embargo, es bien sabido que en la leche materna pasteurizada se afectan algunas de sus propiedades nutricionales y biológicas, varios estudios se han realizado para investigar los efectos de la pasteurización Holder sobre las propiedades nutricionales e inmunológicas de la leche materna (21).

Otra importante fuente de variabilidad está representada por el hecho de que la pasteurización Holder de la leche materna a menudo se simula en pequeñas alícuotas. Por otra parte, los pasteurizadores modernos requieren mucho menos tiempo para calentar y enfriar que los más antiguos, cambiando así la cinética de las respuestas térmicas de compuestos sensibles al calor (21).

Los estudios futuros deben estar destinados a confirmar los datos actualmente disponibles mediante la investigación de análisis más reproducibles, evitando al mismo tiempo la introducción de sesgos potenciales, con el fin de comprender los efectos reales de los procesos realizados por el banco de leche, refrigeración, congelación y pasteurización de la leche materna (21).

3. JUSTIFICACION

Se sabe que la leche materna ayuda al correcto desarrollo del neonato así como a evitar infecciones en éste, sin embargo es de gran importancia determinar si la leche materna actúa como un factor antibacteriano y como le afectan los procesos de conservación: refrigeración, congelación y pasteurización que se llevan a cabo en el banco de leche y que efecto tiene en su capacidad de inhibir patógenos como *Escherichia coli*. El banco de leche da la oportunidad de administrar leche homóloga y heteróloga, según sea el caso.

La sepsis neonatal y la enterocolitis es un problema de salud que afecta a un importante número de pacientes que nacen en el Hospital Materno Infantil Josefa Ortiz de Domínguez, el cual causa problemas en el crecimiento y desarrollo del neonato hasta complicaciones mayores como discapacidad cognitiva, diarrea, deshidratación o la muerte, así como una estancia hospitalaria prolongada.

Así se demostrará la importancia que tiene la leche humana y los banco de leche al administrar leche materna exclusiva a los recién nacidos con patologías como la sepsis neonatal o enterocolitis, para poder responder así la siguiente pregunta en la investigación, ¿cuál de los procesos de conservación (refrigeración, congelación y pasteurización) realizados en el banco de leche humana afectan la actividad antibacteriana de la leche materna?, para posteriormente encontrar y emplear el método más seguro de nuestros procesos de conservación.

4. HIPÓTESIS

Los procesos de conservación (refrigeración, congelación y pasteurización) realizados en el banco de leche humana afectaran la actividad antibacteriana de la leche materna.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana de la leche materna de diferentes etapas (calostro, transición y madura) recolectada en el banco de leche de la unidad hospitalaria, después de haber sido sometida a diferentes procesos de conservación (refrigeración, congelación y pasteurización).

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la acción antibacteriana de la leche humana cruda y almacenada en refrigeración y congelación en pruebas *in vitro* contra *Escherichia coli*.
2. Evaluar la acción antibacteriana de la leche humana pasteurizada en pruebas *in vitro* contra *Escherichia coli*.
3. Evaluar la acción antibacteriana de la leche humana pasteurizada hidrolizada con pepsina y tripsina en pruebas *in vitro* contra *Escherichia coli*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Selección de muestras

- Leche humana fue recolectada en el banco de leche materna del Hospital Materno Infantil Josefa Ortiz de Domínguez. La extracción se realizó en el hogar de la donadora y en el lactario de la unidad hospitalaria.
- Los criterios de selección de la muestra fueron los siguientes:

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
<p>-Mujeres lactantes mayores de 18 años, que tengan hospitalizado a su hijo en algún servicio de pediatría en el H.M.I. Josefa Ortiz de Domínguez.</p> <p>-Mujeres lactantes mayores de 18 años, referidas de clínica de lactancia materna, u otras referencias que deseen ser donadoras.</p> <p>-Cumplan con los criterios para donar leche: Cuestionario para clasificar a la donadora y prueba rápida diagnóstica inmunológica de VIH-VDRL.</p> <p>-Recolección de leche por extracción en hogar o banco de leche.</p> <p>-Las Muestras de leche deben cumplir con los rangos de normalidad establecidos por los bancos de leche.</p>	<p>-Mujeres lactantes que no cumplan con los criterios para donar leche Cuestionario para clasificar a la donadora y prueba rápida diagnóstica inmunológica de (VIH-VDRL).</p> <p>-Muestras de leche materna que no cumplan con los rangos de normalidad establecidos por los bancos de leche.</p> <p>-Muestras de leche que no hayan cumplido los criterios de almacenamiento establecidos.</p> <p>-Donadoras con problemas de grietas/heridas en pezones con sangrado, mastitis o abscesos.</p> <p>-Donadoras con tratamiento médico para tiroides y cáncer.</p>	<p>-Defunción de la donadora.</p> <p>-Muestras de leche materna contaminadas con sangre, moco u otro cuerpo extraño.</p> <p>-Muestras de leche que no cumplan con los parámetros de normalidad organolépticas.</p>

Los procesos de conservación estudiados para la leche materna son los siguientes:

- 1) Muestras de leche materna almacenada en refrigeración a 4°C de 24 a 48 h.
- 2) Muestras de leche materna almacenada en congelación a -20°C por 15 días.
- 3) Muestras de leche pasteurizada sometida a una temperatura de 62.5°C por 30 min.

Las condiciones anteriores fueron evaluadas en los tres tipos de leche: calostro, transición y madura.

6.2 Actividad antibacteriana de leche materna

- Se empleó una cepa de *Escherichia coli* aislada de un hemocultivo de neonato con sepsis en el laboratorio del Hospital Materno Infantil Josefa Ortiz de Domínguez. La cepa fue identificada por API 20 E y conservada en agar McConkey.
- La cepa de *Escherichia coli* fue resembrada antes de ser usada en cada experimento en 10 ml de caldo nutritivo a 37°C durante 24 horas.

Cada análisis de actividad antibacteriana se realizó por triplicado para los distintos tipos de leche (calostro, transición y madura) y métodos de almacenamiento (refrigeración, congelación y pasteurización). El procedimiento que se realizó es el siguiente:

- Se utilizaron 10 ml de leche, de los cuales 5 ml se utilizaron para analizar leche entera y 5 ml fueron centrifugados para obtener leche descremada.
- Como medio control se utilizaron 5 ml de caldo nutritivo.
- Se preparó una suspensión bacteriana de *E. coli*, la cual fue incubada por 24 h a 37 °C en caldo nutritivo. Mediante absorbancia, se estandarizó el inóculo de *E. coli* a un patrón de 0.5 de McFarland.

- La prueba se realizó inoculando 900 µl de leche materna (entera y descremada) y 900 µl de caldo nutritivo con 100 µl de la suspensión bacteriana de *E. coli*, previamente estandarizada. Se incubó a 37 °C durante 4 horas.
- Se tomaron alícuotas de 100 µl a las 0, 2 y 4 horas de incubación tanto de la leche como del caldo nutritivo, y posteriormente se evaluó el crecimiento por cuenta en placa.
- Se calculó la inhibición del crecimiento (UFC/ml) con la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{Crecimiento en leche}}{\text{Crecimiento en control}} \times 100$$

6.3 Actividad antibacteriana de leche materna hidrolizada

Para evaluar el efecto que puede tener la leche materna pasteurizada e hidrolizada (como sucede en el tracto digestivo) en la actividad antibacteriana contra *E. coli* se realizó el siguiente procedimiento:

- Se utilizaron enzimas gástricas pepsina y tripsina, para simular las condiciones *in vivo* del tracto gastrointestinal como lo reporta Oshawa *et al.* en 2008 (26).
- Se tomó una alícuota de 1000 µl de leche materna ajustada a un pH de 2 con HCl 10N y se adicionaron 500 µl de una solución de pepsina (100 mg/ml) a un pH de 2. Se incubó a 37 °C por 90 minutos, con agitación constante a 150rpm.
- Posteriormente se ajustó el pH de la mezcla de la reacción a 7.5, y se adicionaron 500 µl de una solución de tripsina (200 mg/ml). Se incubó por 240 minutos a 37 °C, con agitación constante a 150 rpm.

- En las leches obtenidas de esta forma se determinó la actividad antibacteriana como se indica en la sección 6.2.

6.4 Crecimiento por cuenta en placa

Para conocer el crecimiento de *E. coli* en las pruebas de actividad antibacteriana se realizó la técnica de cuenta en placa como lo reporta Weng *et al* en 2004 (25).

- Las muestras que se obtuvieron a las 0, 2 y 4 de cada prueba fueron diluidas en agua peptonada, realizando diluciones seriadas como lo indica la Figura 4.

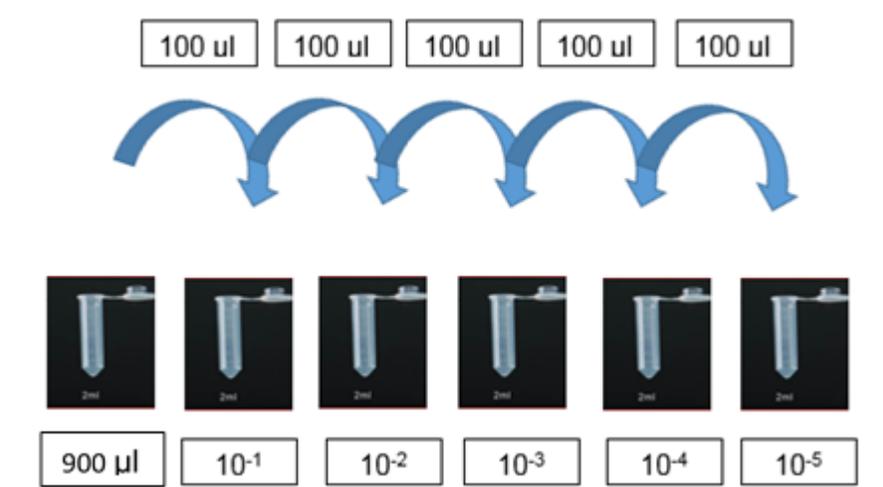


Figura 4. Diluciones en agua peptonada de las diferentes muestras de leche materna y control (caldo nutritivo)

Posteriormente se realizó la siembra en placa en agar nutritivo, como se indica en la Figura 5. Sembrando 10µl de cada dilución y se incubo a 37 °C durante 24 horas.

- Finalmente se hizo el conteo de colonias formadas en cada cuadrante de dilución 10⁻²,10⁻³,10⁻⁴,10⁻⁵. Para reportar el crecimiento en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

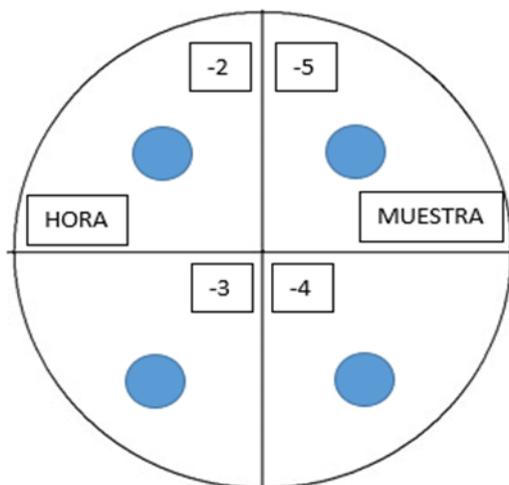


Figura 5. Placa de agar nutritivo dividida en 4 cuadrantes correspondientes a las diluciones sembradas de cada muestra.

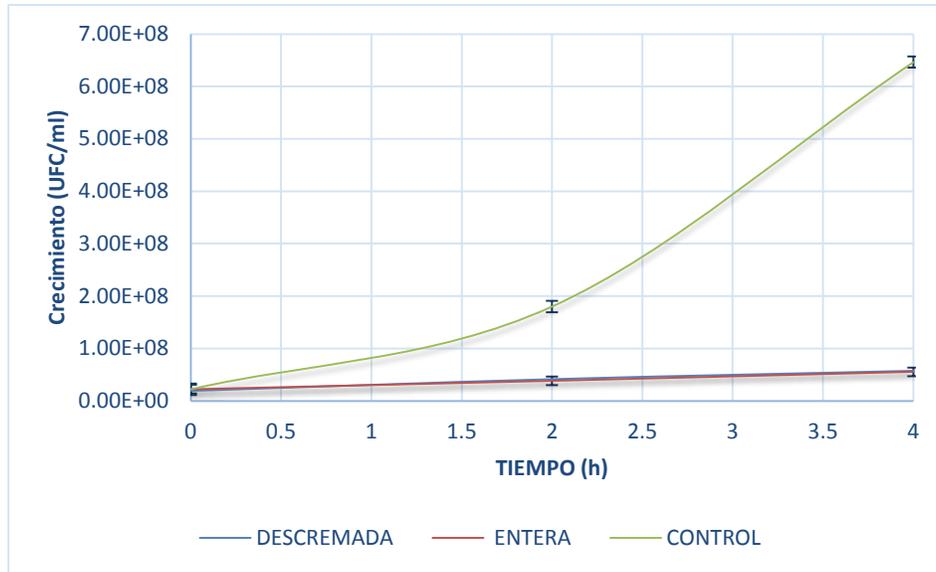
7. RESULTADOS

7.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LECHE HUMANA REFRIGERADA

Uno de los objetivos fue evaluar la actividad antibacteriana de la leche materna refrigerada contra *Escherichia coli*. Se puede observar en las gráficas 1, 2 y 3 en la leche materna de tipo calostro, transición y madura descremada y entera respectivamente el crecimiento de *E. coli* fue menor con respecto al medio control (caldo nutritivo).



Gráfica 1. Crecimiento de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo calostro refrigerado a 4 °C



Gráfica 2. Crecimiento de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo transición refrigerada a 4 °C.



Gráfica 3. Crecimiento de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo madura refrigerada a 4 °C

El efecto antibacteriano de la leche refrigerada en el crecimiento de *E. coli* también es evidente cuando se calcula la inhibición del microorganismo con respecto a su crecimiento en el medio control (caldo nutritivo). Se puede observar en la Tabla 3 con los tres tipos de leche hubo inhibición del microorganismo con respecto a leche materna refrigerada presento actividad antibacteriana contra *E. coli*.

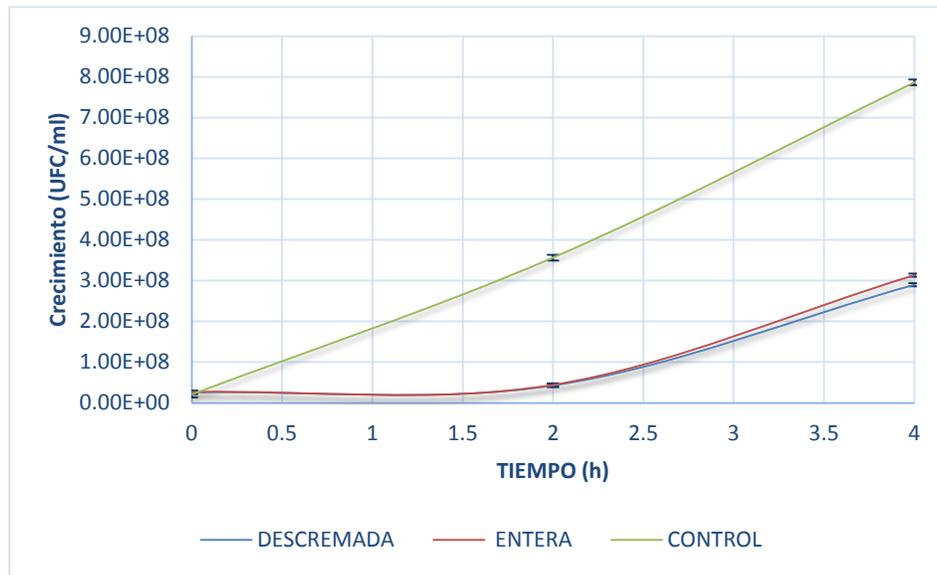
Este análisis muestra que la actividad antibacteriana de la leche materna refrigerada (24 a 48 horas), se conserva en buena medida en calostro y leche de transición, mientras que en leche madura la actividad antibacteriana disminuyo. La leche de tipo calostro obtuvo la mayor inhibición probablemente por las grandes concentraciones en biocomponentes que se presentan en esta etapa de lactancia a diferencia de los otros tipos de leche en los que van disminuyendo las concentraciones de muchos de sus componentes. Comparando los resultados con lo reportado por Martínez-Costa *et al.* (2007) (24), reportaron que la actividad antibacteriana de la leche madura disminuye conforme aumenta el tiempo de almacenamiento en refrigeración, obteniendo solo el 9% de inhibición de *E. coli* a las 72 h.

Tipo de leche	Muestra	Inhibición (%)
Calostro	Entera	97
	Descremada	97
Transición	Entera	91
	Descremada	91
Madura	Entera	55
	Descremada	48

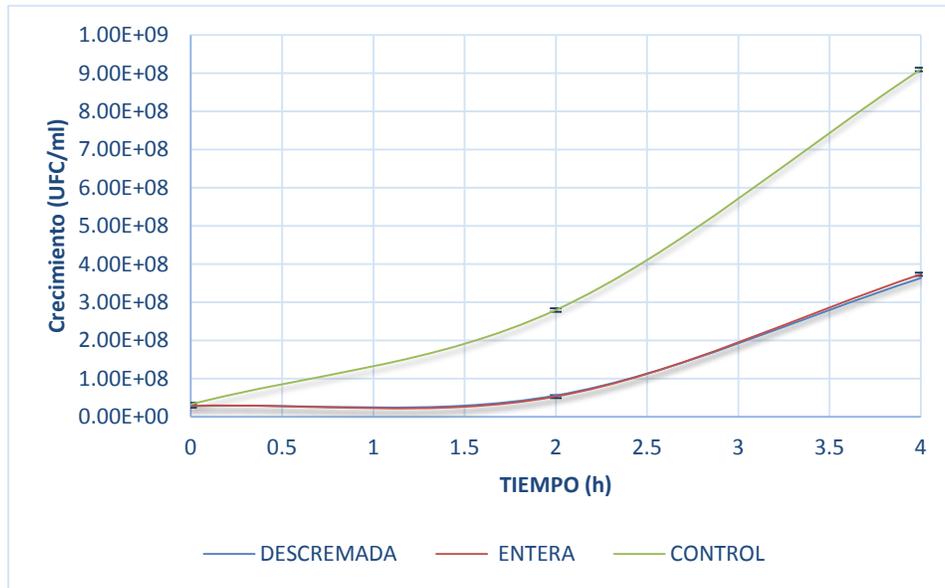
Tabla 3. Inhibición de *E. coli* en los tres tipos de leche refrigerada.

7.3 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LECHE HUMANA CONGELADA

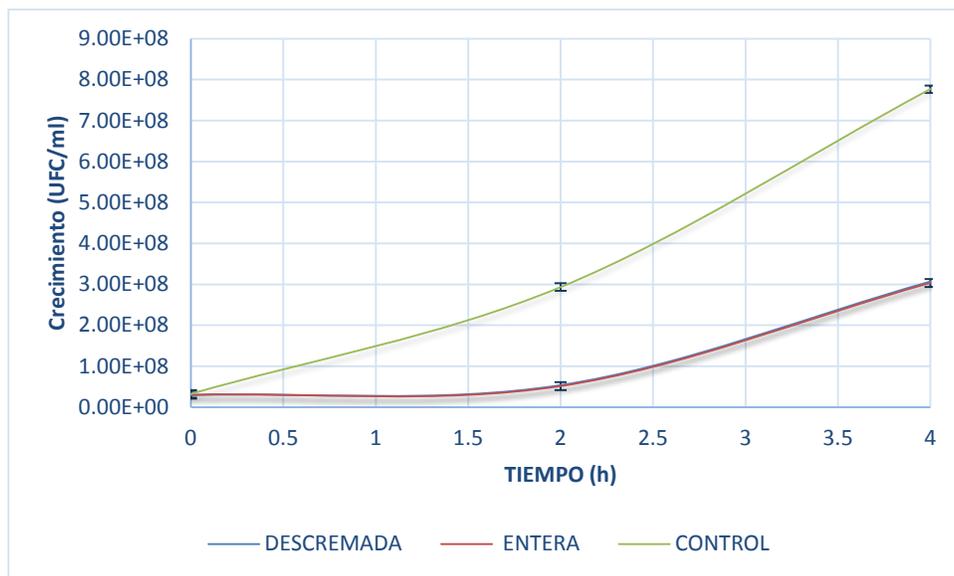
Otro de los objetivos del proyecto fue evaluar la actividad antibacteriana de la leche materna congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ contra *Escherichia coli*. Se puede observar en las gráficas 4, 5 y 6 en los tres tipos de leche materna, calostro, transición y madura el crecimiento de *E. coli* fue menor con respecto al medio control (caldo nutritivo).



Gráfica 4. Crecimiento de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo calostro congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$



Gráfica 5. Crecimiento de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo transición congelada a -20 °C



Gráfica 6. Crecimiento de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo madura congelada a -20 °C

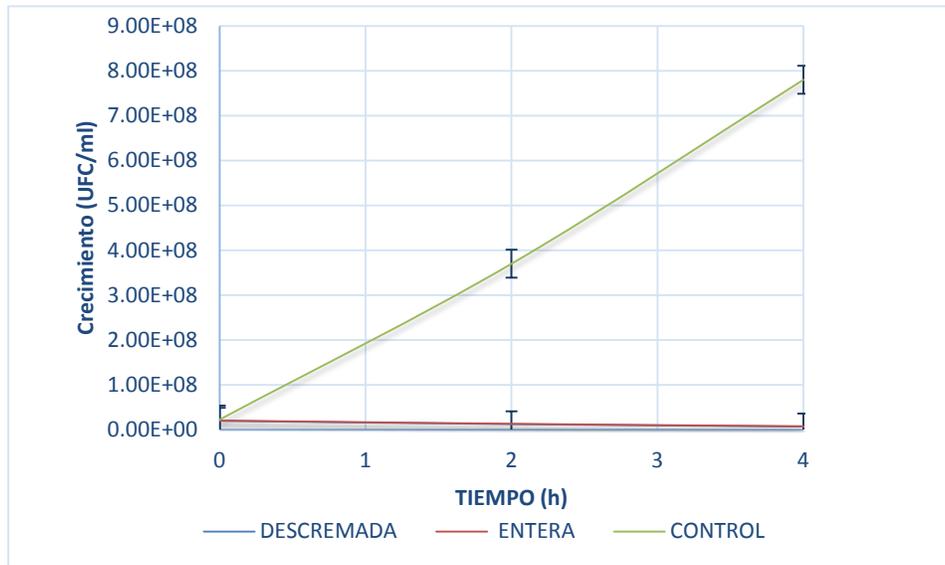
El efecto antibacteriano de la leche congelada en el crecimiento de *E. coli* también es evidente cuando se calcula la inhibición del microorganismo con respecto a su crecimiento en el medio control (caldo nutritivo). Se puede observar en la Tabla 4 en los tres tipos de leche hubo inhibición del microorganismo por lo que podemos decir que la leche materna congelada presentó actividad antibacteriana contra *E. coli*, sin embargo, es importante mencionar que la inhibición del microorganismo fue menor a lo obtenido en la leche refrigerada. Takci *et al.* (2012) (23) reportan que no hay disminución de la actividad antibacteriana cuando conservan la leche a -20 °C durante 1 mes, mientras que a 3 meses si hay disminución. La diferencia en los resultados probablemente se debe a que en esta investigación se hizo una selección de leche por cada etapa de lactancia, mientras que en la referencia mencionada se trabajó con leche tipo calostro y transición indistintamente.

Tipo de leche	Muestra	Inhibición (%)
Calostro	Entera	60
	Descremada	63
Transición	Entera	60
	Descremada	61
Madura	Entera	61
	Descremada	60

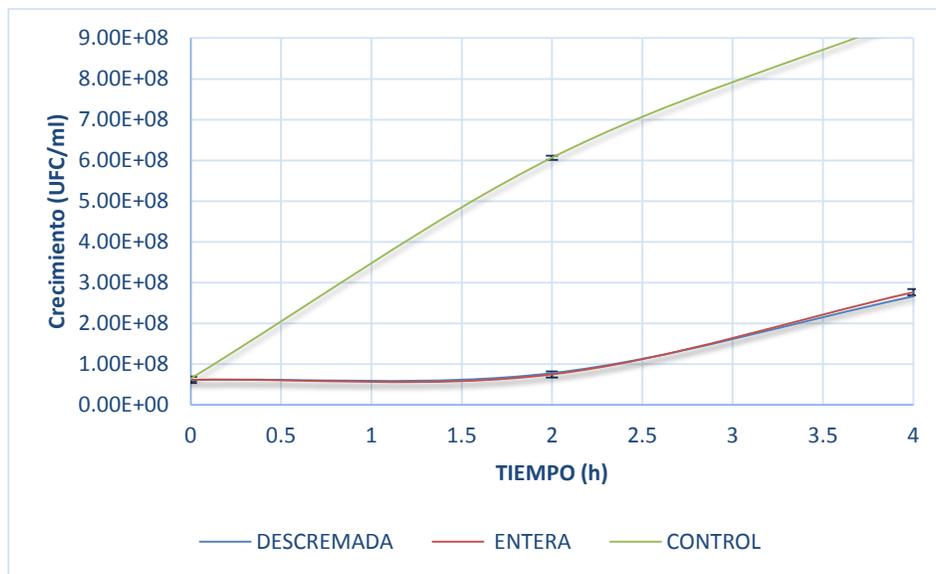
Tabla 4. Inhibición de *E. coli* en los tres tipo de leche congelada.

7.4 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LECHE HUMANA PASTEURIZADA

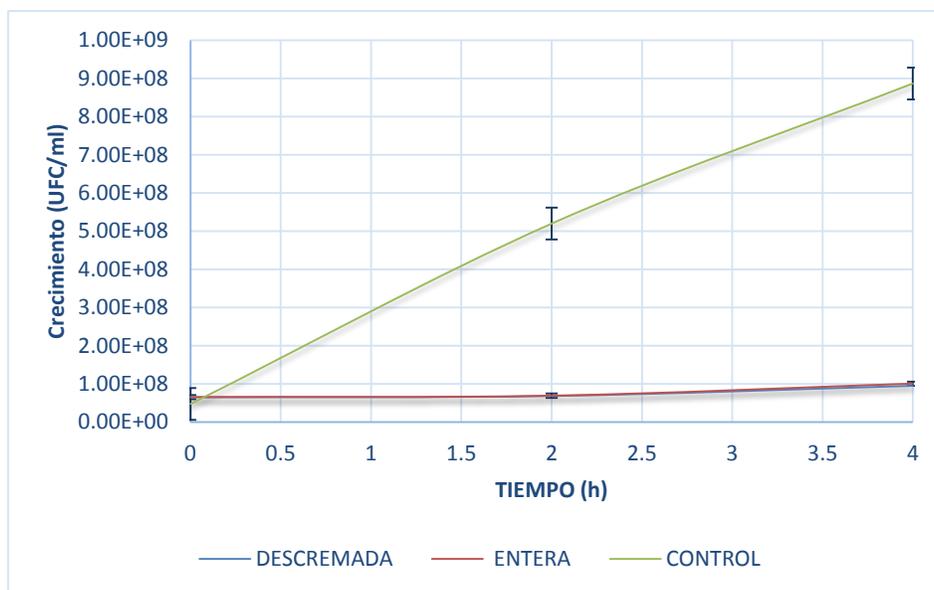
En general, existen estudios que indican que pasteurizar la leche humana afecta varios de sus componentes, aunque resulta difícil cuantificar el impacto que tiene. Uno de los objetivos de esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana de la leche materna pasteurizada. Se puede observar en las gráficas 7, 8 y 9 en los tres tipos de leche materna, calostro, transición y madura el crecimiento de *E. coli* fue menor con respecto al medio control (caldo nutritivo), con lo que se demuestra que la actividad antibacteriana de la leche pasteurizada no es afectada por el tratamiento térmico dado.



Gráfica 7. Crecimiento de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo colostro pasteurizado



Gráfica 8. Crecimiento de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo transición pasteurizada



Gráfica 9. Crecimiento de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo madura pasteurizada

El efecto antibacteriano de la leche pasteurizada en el crecimiento de *E. coli* también es evidente cuando se calcula la inhibición del microorganismo con respecto a su crecimiento en el medio control (caldo nutritivo). Se puede observar en la Tabla 5 con los tres tipos de leche hubo inhibición del microorganismo por lo tanto la leche materna pasteurizada mantiene su actividad antibacteriana contra *E. coli*. Este análisis muestra que la actividad antibacteriana de la leche materna pasteurizada, es mayor en el calostro, lo cual probablemente se deba a que la composición de la leche varía en cada etapa de la lactancia. Peila *et al.* en 2016 (21) reportan que el proceso de pasteurización Holder (62.5 °C, 30 minutos) provoca la disminución de proteínas de entre las cuales la lisozima y lactoferrina presentan actividad antibacteriana, así como también hay disminución de las inmunoglobulinas; mientras que los oligosacáridos no presentan una disminución y se ha reportado que estos tiene actividad anti-infecciosa.

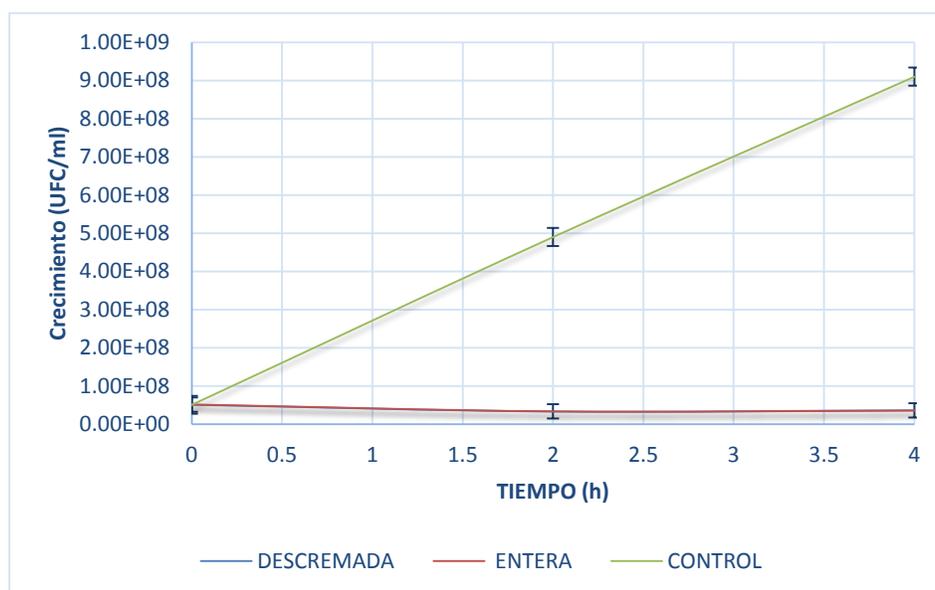
En este proyecto no cuantificamos los biocomponentes presentes en la leche materna a diferencia de los autores ya mencionados, pero obtuvimos resultados muy favorables para la leche materna pasteurizada en cuanto a su actividad antibacteriana, ya que la inhibición de *E. coli* en la leche pasteurizada fue similar a la obtenida en la leche materna refrigerada, lo cual nos indica que la pasteurización es un método de conservación adecuado para la leche humana.

Tipo de leche	Muestra	Inhibición (%)
Calostro	Entera	99
	Descremada	99
Transición	Entera	71
	Descremada	72
Madura	Entera	87
	Descremada	87

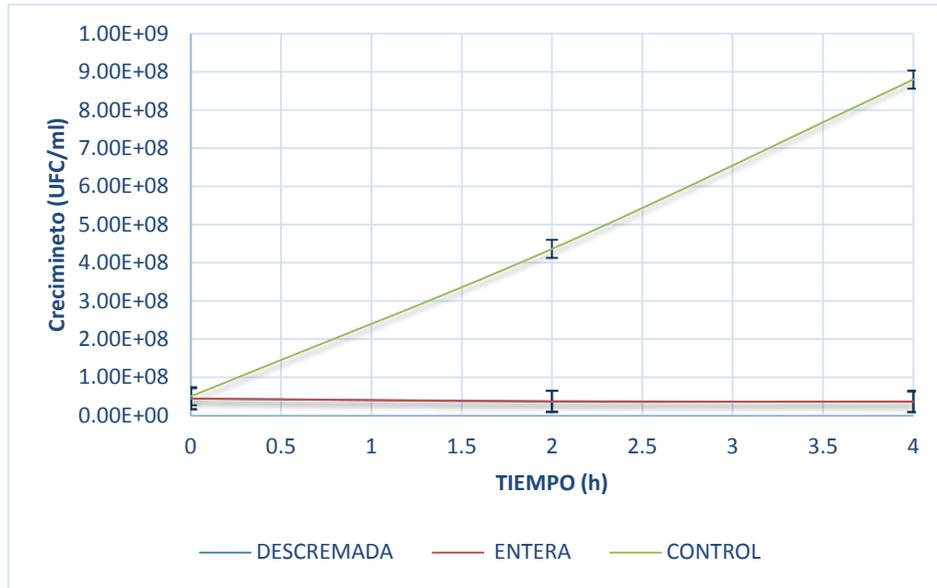
Tabla 5. Inhibición de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo calostro pasteurizado

7.5 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LECHE HUMANA HIDROLIZADA

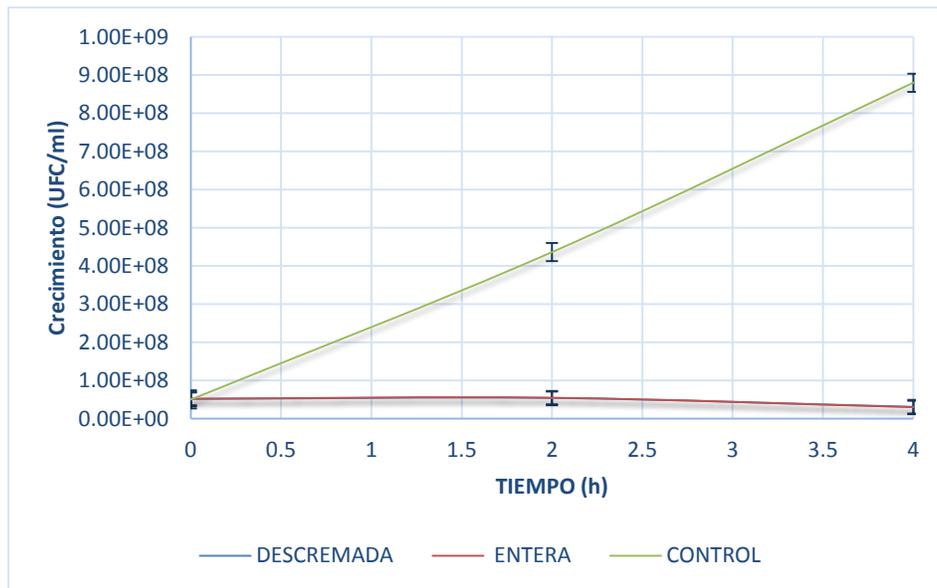
Se ha reportado que los péptidos generados a partir de la hidrólisis de proteínas de la leche presentan actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas, así mismo en la presente investigación se evaluó la actividad antibacteriana de la leche materna pasteurizada hidrolizada con pepsina y tripsina (enzimas gástricas) contra *Escherichia coli*. Se puede observar en las gráficas 10, 11 y 12 en los tres tipos de leche materna, calostro, transición el crecimiento de *E. coli* fue menor con respecto al medio control (caldo nutritivo) con lo que se demuestra que la leche pasteurizada e hidrolizada presento actividad antibacteriana contra *E. coli*.



Gráfica 10. Crecimiento de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo calostro pasteurizada e hidrolizada con pepsina y tripsina



Gráfica 11. Crecimiento de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo transición pasteurizada e hidrolizada con pepsina y tripsina



Gráfica 12. Crecimiento de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo madura pasteurizada e hidrolizada con pepsina y tripsina

Se puede observar en la Tabla 6 con los tres tipos de leche hubo inhibición del microorganismo en lo que se refiere a leche materna pasteurizada e hidrolizada presento actividad antibacteriana contra *E. coli*. Este análisis muestra que la actividad antibacteriana de la leche materna de transición y madura pasteurizada e hidrolizada, es mayor que la leche pasteurizada de las mismas etapas (Tabla 5) entonces podemos decir que los péptidos generados por la hidrolisis enzimática aumentaron la actividad antibacteriana contra *E. coli*. Con estos resultados *in vitro* se demuestra que la actividad antibacteriana de la leche materna de transición y madura con la simulación de la digestión enzimática aumenta y puede brindar protección contra microorganismos patógenos a los neonatos.

Tipo de leche	Muestra	Inhibición (%)
Calostro	Entera	96
	Descremada	96
Transición	Entera	96
	Descremada	96
Madura	Entera	97
	Descremada	96

Tabla 6. Inhibición de *E. coli* en leche entera y descremada de tipo transición pasteurizada e hidrolizada con pepsina y tripsina

Dallas *et al.* en 2013 (20) reportaron la existencia de péptidos bioactivos producidos *in vivo* en la glándula mamaria los cuales mostraron actividad antibacteriana contra *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. Su *et al.* En 2017 (22) estudiaron la producción de péptidos bioactivos en leche humana producidos *in vitro* simulando la digestión en donde adicionaron pepsina y sales biliares, encontraron secuencias de péptidos con probable actividad antimicrobiana.

8. CONCLUSIONES

- Se evaluó la actividad antibacteriana de la leche materna de diferentes etapas (calostro, transición y madura) recolectada en el banco de leche de la unidad hospitalaria, después de haber sido sometida a diferentes procesos de conservación (refrigeración, congelación y pasteurización). Encontrándose que el mejor proceso para la conservación de la actividad bacteriana fue la refrigeración, sin embargo en los otros procesos de conservación se obtuvo más del 50% de inhibición de *E. coli*, lo que resulta interesante para estos procesos.
- Por otra parte también se demostró que la actividad antibacteriana de la leche materna aumenta después de haber sido hidrolizada con pepsina y tripsina, lo que sugiere que durante la digestión en el tracto digestivo se generan péptidos antibacterianos que dan protección contra infecciones a los neonatos.
- El impacto de esta investigación demuestra que es importante estandarizar los procesos de conservación de leche materna en México debido a que los bancos de leche son relativamente nuevos y los procesos realizados se han homologado en experiencias de otros países, pero no han sido óptimos debido a que no se cuenta con las mismas condiciones.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Temboury M; Aguayo J; Arena J. Lactancia materna: guía para profesionales comité de lactancia materna de la asociación española de pediatría (A.E.P.) Monografía de la Asociación Española de Pediatría nº 5 <http://www.aeped.es/lactanciamaterna/libro1.htm>
2. García R. Composición e inmunología de la leche humana, Acta Pediátrica México, 2011. 32(4): 223-230.
3. Baró I; Jiménez J; Martínez A; Boza J. Bioactive compounds derived from human milk. *Ars Pharmaceutica*. 2001. 42(1): 21-38.
4. Turín C; Ochoa T. El papel de la leche materna en la prevención de la diarrea infantil en el mundo en desarrollo. *Current Tropical Medicine Reports*. 2014. 1 (2): 97-105.
5. Rodríguez F; Vázquez I; Ramos G. Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: mecanismo y aplicaciones clínicas potenciales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2005. 47 (3-4): 102-111.
6. Miñana V. Oligosacáridos en la leche humana. *Acta Pediátrica Española*. 2007. 65(3):129-133.
7. Gudiel M; Goñi I. Oligosacáridos de la leche humana: papel en la salud y en el desarrollo del lactante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2001. 51(4): 332-339.
8. Domínguez A; Vázquez I; Ramos G. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2009. 59(4): 358-368.
9. Wada Y; Lönnerdal B. Bioactive peptides derived from human milk proteins—mechanisms of action. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2014. 25(5): 503-514.
10. Gómez C; Pérez D; Bernal M; Periago M; Ros G. Functional compounds in breast milk. *Enfermería Global*, 2009. 16: 1-14.

11. Arena J; Gaya A. V Congreso español de lactancia materna. Marzo 2009
http://www.calidadasistencial.es/images/gestion_soc/congresos_anteriores/13.pdf
12. Gormaz M; Roqués V; Dalmau J; Vento M; Torres E; Vitoria I. Actividad de un banco de leche humana implantado en una unidad neonatal. Acta Pediátrica Española. 2011. 69 (6): 283-287.
13. Sager G. Bancos de leche humana pasteurizada. Programa Nacional de Actualización Pediátrica. 2009. módulo 1, capítulo 2. 26-39.
http://www.sap.org/pronap/pronap2009/modulo1/Pronap2009_cap2.pdf
14. Liebert M. Protocolo clínico #8: Almacenamiento de la leche humana. Información para el uso casero en bebés a término. Medicina de la Lactancia Materna; 2010. Capítulo 2, 5(3): 1-8.
15. Vázquez A. Propiedades antimicrobianas de la leche materna madura contra enterobacterias en niños menores de 2 años de edad, pruebas *in vitro*, Departamento de microbiología facultad de medicina. Universidad de el Salvador; 2000. 2-47.
16. Evans T. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. Archives of Disease Childhood. 1978. 53 (3): 239-241.
17. Ford J., Law B. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. The Journal of Pediatrics. 1977. 90: 29-35.
18. Maury E. Changes in protein composition of mature breast milk during storage by freezing. Pediatría. 2010. 37(3):187-194.
19. Chang J. Influence of prolonged storage process, pasteurization, and heat treatment on biologically-active human milk proteins. Pediatrics and Neonatology. 2013. 54: 360-366.
20. Dallas D. Extensive *in vivo* human milk peptidomics reveals specific proteolysis yielding protective antimicrobial peptides, Journal of Proteome Research. 2013. 12(5): 2295–2304.

21. Peila C. The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutrients*. 2016. 477(8): 1-19.
22. Su M. Comparative analysis of human milk and infant formula derived peptides following *in vitro* digestion. *Food Chemistry*. 2017. 221: 1895-1903.
23. Takci S. Effects of Freezing on the Bactericidal Activity of Human Milk. *Journal Pediatric Gastroenterology*. 2012. 55(2): 146-9.
24. Martínez-Costa C. Effects of refrigeration on the bactericidal activity of human milk: A preliminary study. *Journal Pediatric Gastroenterology. Nutrition*. 2007. 45:275–277.
25. Weng, A. Z., Iglesias, H. B., Abreu, O. M. y J.R. Beltrán. 2004. Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencia. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 42 (1): 1-7.
26. Ohsawa, K., Satsu, H., Ohki, K., Enjoh, M., Takano. T. y Shimizu, M. 2008. Producibility and Digestibility of Antihypertensive β -Casein Tripeptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in the Gastrointestinal Tract: Analyses Using an *in Vitro* Model of Mammalian Gastrointestinal Digestion. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 56, 854–858.