

NUTRICIÓN DE LA MADRE AL BEBÉ

ACTIVIDAD DE LA α -AMILASA EN LECHE MATERNA EN LOS PRIMEROS 50 DÍAS POSTPARTO

ACTIVITY OF α -AMYLASE IN HUMAN MILK IN THE FIRST 50 DAYS POSTPARTUM

Gabriela María Silenzi Usandivaras¹, María Eugenia Pérez², Liliana Chireno³¹ Instituto de Genética, Fundación Miguel Lillo, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina² Instituto de Fisiología Animal, Fundación Miguel Lillo, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina³ Instituto de Maternidad Nuestra Sra. de las Mercedes, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina

Correspondencia: Gabriela María Silenzi Usandivaras

E-mail: gmsilenzi@lillo.org.ar

Presentado: 15/08/18. Aceptado: 26/12/18

Conflictos de interés: las autoras declaran no tener conflictos de interés

RESUMEN

Introducción: la α -amilasa es una enzima que tiene la capacidad de digerir uniones α (1,4). En la leche sus funciones son poco conocidas.

Objetivos: determinar la actividad de la α -amilasa en el suero lácteo humano.

Materiales y métodos: la medición se realizó con un kit comercial para determinación de amilasa sérica y se utilizaron muestras de leche humana.

Resultados: se encontró una actividad promedio de 2.000 U/l. La comparación de las medias de los valores de actividad desde el segundo al quinto día ($1,372 \pm 0,796$) con los correspondientes al lapso desde el sexto día al cuadragésimo séptimo ($0,412 \pm 0,250$) demostró que los valores eran significativamente diferentes ($p < 0,0025$). Los coeficientes de variación de los dos grupos mencionados (1-5 días y 6-47 días) fueron 58 y 61% respectivamente. De manera adicional, la expresión de la amilasa mostró una gran variación entre madres.

Conclusiones: a partir de esta información y de los antecedentes bibliográficos, la α -amilasa láctea tendría una función de defensa en el organismo del recién nacido lactante, y recién al iniciar la alimentación suplementada cumpliría el rol conocido. Aún así el significado biológico de su función en la leche es un problema abierto.

Palabras clave: α -amilasa; enzimas; leche humana; calostro.

Actualización en Nutrición 2019; Vol. 20 (02-06)

ABSTRACT

Introduction: the α -amylase is an enzyme that has the ability to digest α (1,4) junctions. In milk, its functions are little known.

Objectives: the aim of this work was to determinate α amylase activity in human milk.

Materials and methods: the measurement was made with a commercial kit for serum amylase determination and samples of human milk were used.

Results: it was found an average activity of 2.000 U/l. The comparison of the means of activity values from the second to the fifth day (1.372 ± 0.796) with those corresponding to the lapse from day 6 to 47 (0.412 ± 0.250), showed that the values were significantly different ($p < 0,0025$). The coefficients of variation of the two groups mentioned (1-5 days and 6 to 47 days) were 58% and 61% respectively. Additionally, the expression of amylase showed great variation among mothers.

Conclusions: from this information and the bibliographic background, the milk α -amylase would have a defense function in the organism and only when starting the supplemented feeding would it fulfill the known role. Even so, the biological significance of its function in milk is an open problem.

Key words: α -amylase; enzymes; human milk, colostrum.

Actualización en Nutrición 2019; Vol. 20 (02-06)

INTRODUCCIÓN

La α -amilasa, enzima conocida ampliamente por cumplir un rol fundamental en la digestión del almidón, está presente en la saliva y en el jugo pancreático, pero también se encontró en la glándula mamaria¹ y en la leche materna². En algunos casos se usa como marcador clínico para el diagnóstico de enfermedades y/o tumores que muestran procesos inflamatorios³⁻⁴. Se caracteriza además por exhibir efectos antimicrobianos⁵⁻⁶. En los recién nacidos la amilasa salival y la amilasa pancreática no se han desarrollado completamente, entonces la actividad de amilasa en el organismo es extremadamente baja.

La α -amilasa fue una de las primeras enzimas nativas identificadas en la leche. En 1936 se demostró que la α -amilasa era la forma principal de la enzima, con una menor cantidad de α -amilasa, y que ambas se encontraban presentes principalmente en el suero lácteo⁷. La α -amilasa láctea es similar a la amilasa salival⁸ y se confirmó también que la amilasa de la leche materna sobrevive a la digestión gástrica y permanece activa en el intestino delgado⁹⁻¹⁰.

En la leche, sus propiedades y posibles funciones en el recién nacido no están del todo claras y son motivo de investigación en estos últimos años. Esta enzima tiene la capacidad de digerir polisacáridos que no están presentes en la leche como almidón y glucógeno por hidrólisis de uniones α (1,4) glucosídicas. La leche humana no contiene almidón pero sí más de 130 oligosacáridos en una alta concentración. Lo mismo ocurre con la leche bovina que no contiene almidón, sólo bajos niveles de oligosacáridos, por lo tanto es lógico pensar que no habría sustrato para esta enzima.

Estos oligosacáridos están formados por lactosa y contienen monosacáridos poco comunes (por ejemplo, fucosa y ácido N-acetilneuramínico) unidos por enlaces glicosídicos especiales; por lo tanto, es improbable que la α -amilasa, la cual es altamente específica para enlaces glicosídicos α (1,4) que unen moléculas de glucosa, pueda hidrolizar los oligosacáridos en la leche⁹. Sin embargo, existe un efecto hidrolítico de esta enzima sobre los polisacáridos que forman la pared celular de las bacterias, por lo cual se ha sugerido que la amilasa de la leche también podría tener actividad antibacteriana⁵⁻⁶ y ésta sería la principal función en la secreción láctea, no obstante, se trata de un campo que necesita estudiarse en mayor profundidad.

La actividad de amilasa es variable entre distintas especies. La leche humana y el calostro contienen

25-40 veces más α amilasa que la leche de vaca¹¹⁻¹². Por otra parte, el nivel de amilasa en leche humana es de 15 a 140 veces mayor en la leche que en el plasma sanguíneo, lo que sugiere que ésta no se transfiere desde la sangre, sino que es sintetizada en la propia glándula mamaria¹³.

La actividad de la α amilasa en la leche humana es elevada en el calostro y tiende a decrecer en la leche madura manteniendo su actividad durante la lactancia prolongada¹⁴⁻¹⁵. Sin embargo no existen suficientes antecedentes acerca de la cantidad y variabilidad en la actividad de esta enzima en la leche materna que puedan servir de referencia a los aspectos relacionados con las características clínicas y biológicas de los recién nacidos y su relación con la misma.

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad de la amilasa en leche de madres adultas, jóvenes y sanas, con la finalidad de obtener un marco de referencia para posteriores estudios sobre la influencia de distintos factores biológicos en la variabilidad de la enzima.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se utilizaron muestras de leche que se obtuvieron a partir de nueve madres jóvenes (23±2 años de edad), pertenecientes a un buen nivel socioeconómico y que presentaban buen estado nutricional. Se obtuvo un promedio de cuatro muestras por madre, extraídas en diferentes intervalos durante los primeros 47 días de lactancia. Todas las muestras se tomaron bajo el consentimiento escrito de las madres participantes en el muestreo. La recolección se efectuó a través de una bomba extractora, en tubos de polipropileno, con el agregado de una gota de solución de bicromato de potasio al 1% como conservante. Una vez en el laboratorio, las muestras se dividieron en alícuotas pequeñas y conservadas a -20°C hasta el momento de su estudio.

Determinación de la actividad de la amilasa

Se utilizó el método cinético del *kit* comercial para determinación enzimática de la amilasa sérica o plasmática provisto por Wiener Lab (Wiener Lab Group, Rosario, Santa Fe, Argentina). La α -amilasa hidroliza el sustrato 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido (CNP-G3) a 30°C para liberar 2-cloro-p-nitrofenol (CNP), formándose también 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltósido (CNP-G2), maltotriosa (G3) y glucosa. El CNP liberado absorbe a 405 nm y la velocidad de aparición del color es directamente proporcional a la actividad enzimática.

Este método fue puesto a punto, en forma previa, para la determinación de la actividad enzimática en lactosuero.

Antes del análisis enzimático se realizaron pruebas para evaluar la probable influencia de la acidez de las muestras dada la metodología utilizada para la obtención del lactosuero (pH entre 4,35 y 4,65) sobre la actividad de la amilasa.

La determinación de la actividad se realizó mediante el método cinético que corresponde a la observación del incremento de la formación del producto (2-cloro-p-nitrofenol) durante los tres minutos de la reacción, que en este lapso es lineal. Los valores se establecieron como unidades amilolíticas por litro, las cuales se obtienen a partir de las lecturas de D.O. (multiplicadas por un factor termodependiente). La absorbancia se leyó a 405 nm.

Los resultados se procesaron con los siguientes programas: Calc de Open Office, GraphPad InStat y GraphPad StateMate.

RESULTADOS

Las pruebas que se realizaron para determinar el efecto de la obtención del lactosuero mediante precipitación ácida de las caseínas demostraron que esta metodología no afectaba la actividad enzimática de la amilasa en las muestras de leche empleadas. La actividad amilolítica promedio fue de 2.000 U/L en las madres analizadas.

En cuanto a la distribución de los valores de actividad amilolítica de todas las muestras estudiadas en función del tiempo de observación (Figura 1), los valores determinados describen una curva descendente, donde los valores medios en los primeros días son tres veces más altos que los observados después de la tercera semana de lactación. Estos resultados son respaldados a través de la comparación de las medias de los valores de actividad desde el segundo al quinto día (1,372±0,796) con los correspondientes al lapso desde el sexto día al cuadragésimo séptimo (0,412±0,250). Los valores significativamente diferentes (p<0,0025) se muestran en la Figura 2.

Los coeficientes de variación de los dos grupos mencionados (uno a cinco días y seis a 47 días) fueron 58 y 61% respectivamente demostrando, de esta manera, que la dispersión de los datos era proporcional a la media.

Por otra parte, la Figura 3 revela una gran variación en la expresión de la amilasa entre las madres. El

análisis de la varianza de las nueve madres, utilizando el período de leche madura (días 6-47), mostró valores significativamente diferentes (ANOVA, p<0,001).

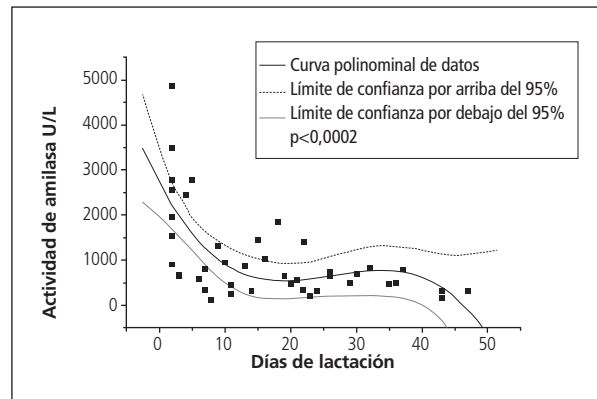


Figura 1: Actividad de α amilasa en relación a los días de lactación.

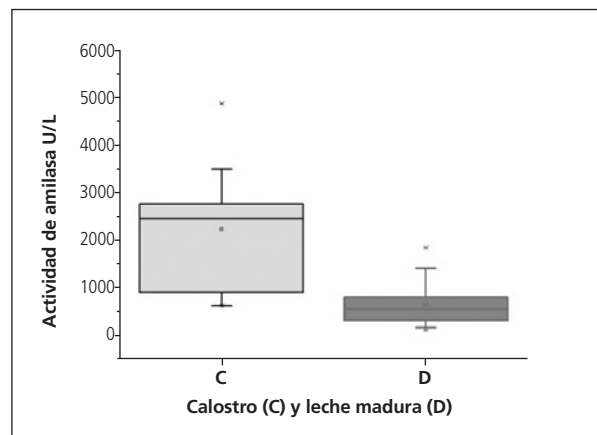


Figura 2: Actividad media de la α amilasa en calostro (C) y leche madura (D).

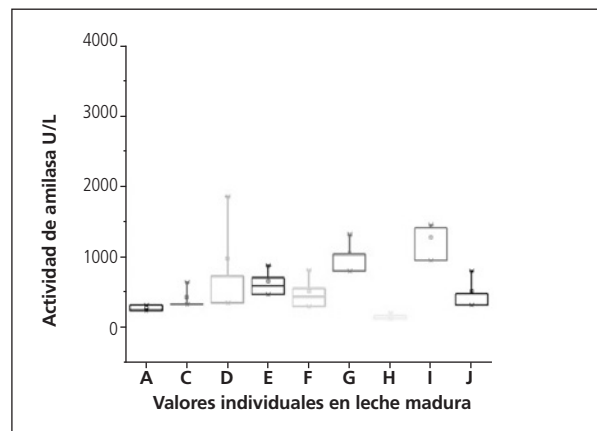


Figura 3: Diferencias individuales de muestras de leche (ANOVA, p<0,01).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a partir de los estudios realizados en el presente trabajo ponen en evidencia variaciones de la actividad de amilasa en la leche materna humana. Este hecho concuerda con estudios poblacionales realizados, tanto en nuestra especie como en otros mamíferos, los cuales revelaron que la expresión de las proteínas presenta variaciones intraespecíficas¹⁶.

Los valores medios de actividad enzimática encontrados en este trabajo se hallan dentro de los valores informados por otros autores^{2,14}. La actividad de la amilasa decrece a medida que avanza la lactación, comportamiento que se detectó tanto en humanos como en otros mamíferos¹⁴. De la misma forma, los resultados confirman que la actividad de esta enzima tiene una gran variabilidad, lo que concuerda con algunos antecedentes¹⁴⁻¹⁵. Los resultados obtenidos por nuestro equipo permitieron además establecer que la mayor varianza se encuentra en el calostro.

Asimismo este trabajo demuestra que existe un rango estadísticamente confiable sobre los valores normales de la actividad amilolítica en el primer mes y medio de la lactación en madres adultas jóvenes (23±2 años) con partos sin problemas (no prematuros) y bebés sanos. Este rango puede utilizarse como marco de referencia para posteriores estudios sobre la influencia o conexión con otros factores biológicos sobre los valores de amilasa en leche materna.

Un posible rol fisiológico de la α -amilasa de la leche sería compensar parcialmente la ausencia de amilasa pancreática, la cual juega un rol fundamental en la digestión. Ello sería porque la α -amilasa de la leche sobrevive a la digestión del ácido gástrico y la pepsina manteniendo su actividad en el intestino^{8,17,18}. Esta enzima puede resistir el pasaje a través del estómago dado que la ingesta de leche materna neutraliza el ácido, así como también diluye e inactiva a la pepsina^{2,18}. Por todo lo expuesto, se sugiere que la α -amilasa láctea tendría un rol más importante en la digestión de carbohidratos en el recién nacido lactante que recibe alimentación complementaria, puesto que la baja secreción de amilasa pancreática y salival en los recién nacidos llega a los niveles adecuados después de los dos años de vida¹⁸.

Por otro lado, la α -amilasa de la leche sería responsable de la hidrólisis de los polisacáridos que forman la pared celular de las bacterias⁵⁻⁶, desarrollando de esta manera una actividad antibacteriana, razón

por la cual una de las funciones más importantes de la amilasa de la leche en el recién nacido sería la de defensa inespecífica. Al igual que lo que ocurre con la lisozima de la leche y las inmunoglobulinas -especialmente la inmunoglobulina A secretoria cuyas concentraciones son elevadas en el calostro y disminuyen a medida que transcurre la lactación-, esta enzima actuaría en defensa del tracto gastrointestinal del recién nacido hasta que su sistema inmune logre la madurez suficiente.

A partir de estas observaciones y teniendo en cuenta los antecedentes que obran sobre el tema, el significado biológico de la función de la amilasa láctea y sus respectivas variaciones representa un potencial campo para futuras investigaciones.

Nuestros resultados exigen continuar con estudios adicionales relacionados con el comportamiento de la α amilasa en la leche de madres de bebés prematuros o portadores de alguna patología asociada, de manera tal de encontrar si existe influencia de determinados factores biológicos sobre la actividad de la amilasa láctea. Otros aspectos a considerar para posteriores estudios serían las condiciones socioculturales, ambientales y nutricionales de las madres, con la finalidad de determinar el rol fisiológico y nutricional de esta enzima presente en la leche materna.

Agradecimientos

A las madres donantes por su invaluable colaboración en la obtención de las muestras.

Este trabajo se realizó con el apoyo de la Fundación Miguel Lillo y del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina (Proyecto CIUNT 26G 415).

REFERENCIAS

1. Groot PC, Bleeker MJ, Pronk JC, Arwert F, Mager WH, Plauta RJ, Eriksson AW, Frauts RR. The human α -amylase multigene family consist of haplotypes with variable numbers of genes. *Genomics* 1989; 5:29-42.
2. Heitlinger LA, Lee PC, Dillon WP, Leberthal E. Mammary amylase: a possible pathway of carbohydrate digestion in infancy. *Pediatric Res* 1983; 17:15-18.
3. Moridani MY, Bromeberg IL. Lipase and pancreatic versus total amylase as biomarkers of pancreatitis: an analytical investigation. *Clin Biochem* 2003; 36(1):31-33.
4. Zakowski JJ, Gregory MR, Bruns DE. Amylase from human serous ovarian tumors: purification and characterization. *Clin Chem* 1984; 30:62-68.
5. Gregory MR, Gregory WW, Bruns DE, Zakowski JJ. Amylase inhibitors neisseria gonorrhoeae by degrading starch in grow medium. *J Clin Microbiol* 1983; 18:1366-1369.

6. Chandheri B, Rojek J, Vickerman MM, Tanger JM, Scannapieco FA. Interaction of salivary alpha-amylase and amylase-binding protein A (Abpa) of *Streptococcus mutans* B M C. *Microbiology* 2007; 7:60.
7. Richardson GA, Hankinson CL. Amylase in cow's milk. *J Dairy Sci* 1936; 19(12):761-772
8. Murray RD, Kerzner B, Sloan HR, Mc Clung HJ, Gilbert M, Ailabouni A. The contribution of salivary amylase to glucose polymer hydrolysis in premature infants. *Pediatr Res* 1986; 20:186-191.
9. Rosenblum JL, Irwin CL, Alpers DH. Starch and glucose oligosaccharides protect salivary type amylase activity at acid pH. *Am J Physiol* 1988; 254: G775-G780.
10. Gnoth MJ, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *Journal of Nutrition* 2000; 130: 3014-3020.
11. Lindberg T, Skude G. Amylase in human milk. *Pediatrics* 1982; 70:235-238.
12. Hamosh M. Nitrogenous components of milk. En: Jensen RG (Ed). *Academic Press, San Diego*. 1995. *Enzymes in human milk*, pp 388-416.
13. Fox P, Kelly A. Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects. Part 1. *Int. Dairy J* 2006; 16: 500-516.
14. Dewit O, Barclay DV, Prentice A. Breast-milk amylase activities during 18 months of lactation in mothers from rural Zaire. *Act Paed* 1993; 82(3): 300-301.
15. Jones JB, Mehta NR, Hamosh M. Alpha amylase in preterm human milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1982; 1(1): 43-48.
16. Silanikove N, Merin, U, Leitner, G. Physiological role of indigenous milk enzymes: An overview of an evolving picture. *Int Dairy J* 2006; 16: 533-545.
17. Leberthal E, Lee PC. Alternate pathways of digestion and absorption in early infancy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1982; 3:1-3.
18. Mason S. Some aspects of gastric function in the newborn. *Arch Dis Child* 1962; 37:387.