

LN Juan Manuel Flores
Alvarado

Asociación del consumo de lácteos con la presencia de β -casomorfina-7 en leche materna madura en mujeres adultas Queretanas

2016



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Asociación del consumo de lácteos con la presencia de β -
casomorfina-7 en leche materna madura en mujeres
adultas Queretanas

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:

LN Juan Manuel Flores Alvarado

Dirigida por:

Dr. Miguel Ángel Duarte Vázquez

Querétaro, Qro. Diciembre, 2016



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

“Asociación del consumo de lácteos con la presencia de β -casomorfina-7 en leche materna madura en mujeres adultas Queretanas”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener grado de

Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:

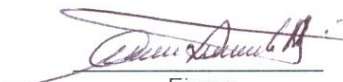
LN Juan Manuel Flores Alvarado

Dirigido por:

Dr. Miguel Ángel Duarte Vázquez

SINODALES

Dr. Miguel Ángel Duarte Vázquez
Presidente



Firma

Dr. Jorge Luis Rosado Loria
Secretario



Firma

Dra. Olga Patricia García Obregón
Vocal



Firma

Dra. Karina de la Torre Carbot
Suplente



Firma

MNH Lorena Guadalupe Oropeza Ceja
Suplente



Firma



Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Director de la Facultad



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro
Diciembre 2016
México

Resumen

Antecedentes: La caseína es una de las proteínas más abundantes en la leche bovina, está constituida por cuatro subunidades α_1 , α_2 , κ y β . Las beta-caseínas (BCN) bovina son cadenas polipeptídicas de 209 aminoácidos representan el 35% de la caseína total de la leche. Las formas más comunes de la BCN en razas de ganado lechero son A1 y A2. La variante de tipo A1 difiere de la A2 al presentar histidina en la posición 67 de su cadena de aminoácidos, mientras que en la A2 se sustituye histidina por prolina. Durante la digestión gastrointestinal de BCN A1 se libera un oligopéptido bioactivo denominado beta-casomorfina-7(BCM-7) bovina, el cual se ha relacionado en la etiología de autismo, esquizofrenia, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y síndrome de muerte súbita del lactante . BCM-7 no se produce de la digestión de la BCN presente en la leche materna, y otros tipos de leche como la de cabra y oveja, debido a que el tipo de BCN es del tipo A2. Por su naturaleza, la leche materna no debería contener BCM-7 bovina, sin embargo existen estudios que demuestran su presencia. **Objetivo:** evaluar si las concentraciones de BCM-7 en leche materna, se relacionan con el consumo de lácteos provenientes de la dieta de las mujeres en el periodo de lactancia. **Material y métodos:** se obtuvieron 3 muestras de leche materna madura (obtenida entre las 3 y 16 semanas después del parto) de 78 mujeres que tuvieron un parto a término (37 – 40 semanas de gestación) . Se determinó BCM-7 bovina por medio de UPLC acoplado a un espectrómetro de masas. Se realizaron análisis descriptivos de la población reportando media y desviación estándar, regresión logística para determinar si la concentración de BCM-7 bovina tiene probabilidad de aumentar si se incrementa la ingestión de proteínas lácteas utilizando el paquete estadístico SPSS v.20 y un valor estadísticamente significativo menor a 0.05. **Resultados:** la concentración media de BCM-7 bovina en muestras de leche materna madura fue de 0.84 ng/mL. No existió diferencias en la concentración residual de BCM-7 bovina con respecto al periodo de lactancia, ni hora del día en que se obtuvo la muestra. Sin embargo hubo una dependencia entre el consumo de proteína láctea y la concentración residual del

péptido. La probabilidad de aumentar la concentración de BCM-7 bovina aumenta 1.8 veces por cada 10 gramos de proteínas lácteas consumidas.

(Palabras clave: beta caseína A1, beta-casomorfina-7, leche materna)

Summary

Abstract: casein is one of the most abundant proteins in bovine milk, consists of four subunits α_1 , α_2 , β and κ . The beta-caseins (BCN) are bovine polypeptide chains of 209 amino acids represent 35% of total milk casein. The most common forms of the BCN in dairy cattle breeds are A1 and A2. The variant differs from the type A1 A2 introducing histidine at position 67 of its amino acid chain, while in the A2 histidine is replaced by proline. During gastrointestinal digestion of BCN A1 a bioactive oligopeptide called beta-casomorphin-7 (BCM-7) bovine, which has been implicated in the etiology of autism, schizophrenia, diabetes mellitus, cardiovascular disease and sudden infant death syndrome is released. BCM-7 is not produced from the digestion of the BCN present in breast milk and other milk such as goat and sheep, because the type of BCN is the type A2. By their nature, breast milk should not contain BCM-7 bovine, however studies show their presence. **Objective:** To evaluate whether the concentrations of BCM-7 in breast milk, are related to the consumption of dairy from the diet of women in breastfeeding. **Methods:** 3 samples of mature breast milk (obtained between 3 and 16 weeks after birth) of 78 women delivery at term (37 - 40 weeks gestation) were obtained. Bovine BCM-7 was determined by UPLC coupled to a mass spectrometer. Descriptive analysis were performed reporting population mean and standard deviation, logistic regression to determine whether the concentration of BCM-7 bovine is likely to increase if the ingestion of milk protein is increased using SPSS v.20 and a statistically significant value less than 0.05. **Results:** The mean concentration of BCM-7 bovine in mature breast milk samples was 0.84 ng/mL. There was no difference in the residual concentration of BCM-7 bovine with respect to lactation period, or time of day the sample was obtained. However there was a dependence between the consumption of milk protein and the residual concentration of the peptide. The probability of increasing the concentration of BCM-7 bovine increases 1.8 times per each 10 grams of milk protein consumed.

(Key words: beta casein A1, beta-casomorphin-7, breast milk)

Dedicatorias

A Dios

A mis padres

Mayra mi hermana

A mis compañeros de laboratorio Carlos Ugalde, Rubí Paredes quienes me apoyaron en área ajena a mi formación, a Dolores Ronquillo, Lorena Oropeza, por su gran ayuda en el trabajo de campo, y en especial al doctor Miguel Ángel Duarte Vázquez.

Y a todas aquellas personas que hicieron posible esta investigación.

Agradecimientos

A CONACyT por brindarme la beca necesaria para poder realizar estudios de maestría.

Al doctor Miguel Ángel Duarte Vázquez, por su tiempo, paciencia y conocimientos.

A mis compañeras de trabajo de campo, quienes fueron de gran ayuda.

Índice

Resumen.....	ii
Summary.....	v
Agradecimientos.....	vii
Índice.....	viii
Índice de Tablas.....	xi
Índice de Figuras.....	xii
I. Introducción.....	1
II. Revisión de literatura.....	3
2.1 Leche bovina.....	3
2.3 Digestión de BCN Bovina.....	5
2.4.1 Absorción de BCM-7 bovina.....	7
2.5 BCM-7 en leche materna.....	8
2.6 BCM-7 en Sangre.....	10
2.7 BCM-7 y su posible participación en alteraciones patológicas.....	11
2.7.1. Diabetes Mellitus Tipo 1.....	11
2.7.2. Síndrome de muerte súbita del infante.....	12
2.7.3. Autismo – Esquizofrenia.....	12
2.7.4. Enfermedades Cardiovasculares.....	13
2.8 Leche Materna.....	14
2.8.1 Composición.....	14
2.8.2 Clasificación.....	14
2.8.2.1 Calostro.....	14
2.8.2.2 Leche de transición.....	14
2.8.2.3 Leche de madura.....	14
2.9 PROTEÍNAS EN LA LECHE MATERNA.....	15
2.9.1 Caseína.....	16
2.9.2 Beta-caseína.....	16
2.9.3 Beta-caseína humana.....	17

III. Justificación	18
IV. Hipótesis	19
V. Objetivos	19
5.1 Objetivo General	19
5.2 Objetivos Específicos	19
6. Materiales y Métodos	20
6.1 Sujetos y consideraciones éticas	20
6.1.1 Tamaño de la muestra	21
6.1.2 Criterios de inclusión	21
6.1.3 Criterios de exclusión	21
6.1.4 Criterios de eliminación	22
6.2 Diseño del estudio	22
6.2.1 Procedimientos	22
6.2.2 Talla y peso	22
6.3 Instrumentos para la obtención de datos	23
6.3.1.1 Antecedentes Clínicos	23
6.3.1.2 Cuestionario Nivel Socioeconómico	23
6.3.1.3 Evaluación de la dieta	23
6.3.4 Determinaciones bioquímicas	24
6.3.4.1 Descremado de la leche materna	25
6.3.4.2 Extracción del péptido BCM-7	25
6.3.4.3 Cuantificación	25
6.3.4.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)	
.....	26
6.3.4.6 Secuenciación de bCSN humana	26
6.3.5 Análisis Estadístico	26
VII. Resultados	28
7.1 Características de la población	28
7.2 Cuantificación de BCM-7 bovina en leche materna	30
7.3 Ingestión de productos lácteos y su asociación con la presencia de BCM-7 bovina	
en leche materna	33
7.3.1 Evaluación dietética	33

7.3.2 Asociación del consumo de proteínas lácteas respecto a la concentración de BCM-7 bovina en leche materna.....	40
7.4 Perfil de proteínas en la leche materna.....	43
7.5 Secuenciación de BCN humana.....	45
VIII. Discusión	47
IX. Conclusión	53
X. Limitaciones del estudio	54
XI. Literatura Citada	55

Índice de Tablas

Tabla		Página
Tabla 1.	Cambios en la secuencia de aminoácidos en variantes de beta-caseína	3
Tabla 2.	Distribución de las variantes del alelo de beta caseína en diferentes razas del ganado bovino	4
Tabla 3.	Estudios que confirman la presencia de BCM-7 en leche materna.	9
Tabla 4.	Estudios que confirman la presencia de BCM-7 en plasma	10
Tabla 5.	Contenido nutrimental de leche materna madura por 100 ml	15
Tabla 6.	Características generales de las participantes (n=78)	29
Tabla 7.	Distribución de macronutrientes en la dieta de mujeres participantes	34
Tabla 8	Ingesta de nutrimentos en mujeres participantes en periodo de lactancia	35
Tabla 9.	Análisis descriptivo de consumo de gramos de proteínas lácteas	39
Tabla 10.	Probabilidad de riesgo de tener un nivel elevado de BCM-7 bovina de acuerdo al consumo de proteínas lácteas por cada 10 gramos	41
Tabla 11.	Probabilidad de aumentar la concentración de BCM-7 bovina de acuerdo a la proporción de productos lácteos consumidos	43
Tabla 12.	Perfil proteico en muestras de leche materna madura	45

Índice de Figuras

Figura		Página
Figura 1.	Digestión de beta caseínas A1 y A2. Kaminski S. 2007.	6
Figura 2.	Transporte de di/tripéptidos y oligopéptidos a través del enterocito al torrente sanguíneo. Adaptada de Wada Y., 2014	8
Figura 3.	Diagrama de selección de las participantes	28
Figura 4.	Distribución porcentual del índice de Masa Corporal (IMC) en mujeres en periodo de lactancia (n=78)	30
Figura 5.	Cromatograma de la determinación de BCM-7 bovina en leche materna	31
Figura 6.	Contenido de BCM-7 bovina (ng/mL) en leche materna de acuerdo a los días post parto	32
Figura 7.	Concentración de BCM-7 bovina y de acuerdo al horario de extracción	33
Figura 8.	Distribución de grupos de alimentos que conforman la dieta de las participantes	37
Figura 9.	Consumo de raciones de productos lácteos por día	37
Figura 10.	Porcentaje de mujeres que consume diferentes tipos de leche	38
Figura 11.	Porcentaje de mujeres que consume diferentes tipos de quesos	39
Figura 12.	Comparación de las concentraciones medias de BCM-7 bovina y consumo en gramos de proteínas lácteas	40
Figura 13.	Probabilidad pronostica del aumento en la concentración de BCM-7 bovina por el consumo de proteínas lácteas	42
Figura 14.	Electroforesis en gel de poliacrilamida de muestras de	44

leche materna madura

Figura 15. Número de aminoácidos alineados entre la bCNS humana y bovina 46

Figura 16. Alineación de la secuencia de aminoácidos de bCNS humana y bovina 46

I. Introducción

La composición de la leche materna durante los primeros seis meses de vida, es adecuada para cubrir los requerimientos energéticos del lactante y asegurar su adecuado crecimiento y desarrollo.

La alimentación de la madre durante en el periodo de lactancia puede influir en la composición de la leche materna. Diversas guías de alimentación para las mujeres en periodo de lactancia, recomiendan el consumo de hasta 4 raciones de productos lácteos al día para asegurar el aporte necesario de proteína, calcio y energía.

En México, como en la mayor parte del mundo, y en la mayor parte del mundo, la leche que se utiliza para la elaboración de productos lácteos, proviene aproximadamente en un 80% del ganado Holstein-Friesian, el cual tiene una alta probabilidad de presentar en su composición proteica a la variable beta caseína A1, la cual al ser digerida por enzimas proteolíticas libera un oligopéptido de 7 aminoácidos denominado beta casomorfina-7 bovina, la cual se ha relacionado en la etiología de diversas patologías en los lactantes como muerte súbita del lactante, autismo, esquizofrenia, diabetes mellitus insulino dependiente, pseudoalergia entre otras.

La leche materna por su naturaleza no debería contener beta casomorfina-7 bovina, sin embargo existen estudios que demuestran la presencia de este oligopéptido en la leche humana, uno de los posibles mecanismos por el cual beta casomorfina-7 está presente, es que el oligopéptido atraviesa la mucosa intestinal, integrándose a la circulación general para pasar a la leche materna.

Actualmente, no existen estudios que evalúen el consumo de productos lácteos en la dieta de la madre con la concentración de beta casomorfina-7 bovina en leche materna. El presente estudio pretende evaluar si las concentraciones de BCM-7 bovina se relacionan con el consumo de productos lácteos provenientes de

la dieta de las mujeres en el periodo de lactancia. La importancia de conocer si la concentración del péptido estudiado depende de la cantidad de lácteos consumidos, permite la posibilidad de crear o elaborar productos lácteos, entre ellos, fórmulas infantiles, que contengan únicamente bCSN A2 evitando la producción de BCM-7 bovina.

II. Revisión de literatura

2.1 Leche bovina

Leche bovina es un fluido dinámico que contiene proteínas, grasa, lactosa, vitaminas y minerales (Nissen, 2013). Su composición proteica por cada 100 ml, es de 3 a 3.5 gramos. Las proteínas de la leche bovina se clasifican en caseínas (constituyendo aproximadamente el 80%) y proteínas del suero, que representan el 20% restante (Bagnicka, 2010; Wattiaux, 2014; Islam, 2014). Las beta caseínas (BCN) están constituidas por cuatro subunidades α_1 , α_2 , κ y β (McLachlan, 2001; Roginski, 2003; Mishra, 2009).

2.2 Beta-caseínas

Las BCN bovina son cadenas polipeptídicas que contienen 209 aminoácidos con un peso molecular de 23,983 Daltons, estas proteínas constituyen el 35% de la caseína total de la leche (Stewart, 1984; Niki, 1994; Mishra, 2009). En la actualidad se conocen 13 variantes genéticas de BCN bovina, las cuales son: A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G, donde las diferencias radican en la posición de los aminoácidos de sus cadenas polipeptídicas (Tabla 1) (Roginski, 2003; Farrell, 2004; Kaminski, 2007).

Tabla 1. Cambios en la secuencia de aminoácidos en variantes de beta-caseína

Variante BCN	Cambio en la secuencia de aminoácido											
	18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	122	138
A2	Ser-P	Arg	Ser-P	Glu	Glu	Pro	Glu	Leu	Gln	His	Ser	Pro
A1						His						
A3										Gln		
B						His					Arg	
C			Ser		Lys	His						
D	Lys											
E				Lys								
F						His						Leu
G						His					Leu	
H1		Cys						Ile				
H2							Glu		Leu			Glu
I									Leu			

Nota: Los espacios vacíos representan el mismo aminoácido respecto a la secuencia de BCN A2
Fuente: Kaminski S. 2007.

Las formas más comunes de la BCN en razas de ganado lechero son A1 y A2, mientras que el tipo B es menos común (Farrell, 2004; Tabla 2).. La proteína

original de BCN en la leche bovina es considerada la tipo A2, mientras que BCN A1 es consecuencia de una mutación genética en algún rebaño de ganado lácteo europeo siglos atrás (Martin, 2003). La mutación natural que dio lugar a esta diferencia es el resultado del cambio en un solo nucleótido en el codón 67 del gen de la BCN bovina, donde una citosina cambia por una adenina, CCT (A2, prolina) CAT (A1, histidina) (Kamiński, 2007), es decir, las variantes de BCN bovina del tipo A1 y B difieren de la variante A2 en un solo aminoácido, la variante de tipo A1 presenta histidina en la posición 67 de su cadena de aminoácidos, mientras que en la A2 tiene prolina (Farrell, 2004; Tabla1).

Tabla 2. Distribución de las variantes del alelo de beta caseína en diferentes razas del ganado bovino

Alelo BCN	Difusión	Especie	Ganado
A1	Común	<i>Bostaurus</i> <i>Bosindicus</i>	La mayoría de las razas
A2	Más común	Todos	Todas las razas
A3	Bastante común	<i>Bos Taurus</i> <i>Bosindicus</i>	Holstein-Friesian, Jersey, Simmental, Sahiwal, Rojo alemán
B	Común	<i>Bostaurus</i> , <i>Bosindicus</i>	La mayoría de raza taurus, Hariana, Choa
B2	Raro	<i>Bostaurus</i>	Ganado ruso
C	Bastante común	<i>Bostaurus</i>	Guernsey, Reggiana, Pinzgauer, Café italiano, Piemontese
D	Raro	<i>Bosindicus</i>	Desi indio, Boran del este africano
E	Raro	<i>Bostaurus</i>	Piemontese
F	Raro	<i>Bostaurus</i>	Meuse-Rhine-Yssel
G	Raro	<i>Bostaurus</i>	Holstein-Friesian
H1	Raro	<i>Bostaurus</i>	Ganado coreano
H2	Raro	<i>Bostaurus</i>	Normande
I	Bastante común	<i>Bostaurus</i>	Piel rojo italiano, Holstein Italiano, Holstein Alemán, Belga azul, Jersey.

Adaptada de Caroli A. et al. 2009.

La frecuencia de los alelos en las razas bovinas Holstein y Ayrshire abarca desde el 63 y 67% de BCN A1, respectivamente, y 35 y 33% del alelo tipo A2. La BCN del tipo A2 se observa con mayor frecuencia en el ganado de raza Guernsey, en la que existe la probabilidad de presentar 1% del alelo A1 y 98% del A2 (McLean, 1984), por otra parte la raza Jersey tiene una frecuencia del 72% para el alelo BCN A2 y 28% para A1 (Kaminski, 2007).

Las BCN del tipo A1 y A2 se han encontrado en productos lácteos (Jarmolowska *et al.*, 1999; Farrell *et. al.*, 2004). En México, del total de la leche que se comercializa el 80% es del ganado Holstein-Friesian, por lo que es probable que la BCN bovina del tipo A1 sea la isoforma más frecuente en productos lácteos consumidos en el país (CONARGEN, 2013).

Se estima que el tiempo que permanece la caseína y otras proteínas lácteas en el organismo humano es aproximadamente entre 2 a 4 semanas, esto se sugiere debido a que en lactantes diagnosticados con alergia a la proteína de la leche de vaca que son alimentados al seno materno, se recomienda a las madres realizar una dieta de exclusión de lácteos por al menos 2 – 4 semanas, periodo en el cual, se observa mejoría en la sintomatología por una disminución o nula concentración de proteínas bovinas en lecha materna (De Greef, 2012).

2.3 Digestión de BCN Bovina

Durante la digestión gastrointestinal de BCN bovina A1 y B, se libera un oligopéptido bioactivo denominado beta-casomorfina-7(BCM-7) bovina (Stewart, 1987). Estudios realizados *in vitro*, demuestran que BCM-7 bovina se produce durante la digestión proteolítica por medio de la acción de las enzimas intestinales pepsina, elastasa pancreática y leucina aminopeptidasa, a partir de las variantes de BCN bovina A1 y B, pero no se produce en el tipo A2. La elastasa rompe el enlace peptídico entre los aminoácidos isoleucina e histidina en la posición 66 y 67, respectivamente, liberando el extremo carboxilo de BCM-7 bovina. La pepsina y leucina aminopeptidasa se requieren para liberar el extremo amino terminal de dicho péptido (Jinsmaa, 1997), ejerciendo su efecto en la posición 59 y 60 (Figura 1).

Un estudio realizado en lactantes por Sun *et al.*, (2003), demostró que BCM-7 puede atravesar las células intestinales (enterocitos) e integrarse a circulación general teniendo una vida media prolongada debido a una menor actividad de la DPP IV.

2.4.1 Absorción de BCM-7 bovina

Existen tres mecanismos principales, en los que se clasifican la absorción intestinal (Figura 2):

1. Transportador dependiente de protones, que permite el transporte activo de di y tripéptidos (Aito-Inoue, 2007)
2. Sistema de transporte intracelular mediado por vesículas también conocido como transitosis (Heyman, 1992) que permite interactuar en la superficie de membrana celular con algunos oligopéptidos especialmente básico y/o hidrófobos y ser absorbidos (Sai, 1998)
3. Difusión paracelular, que permite el paso de oligopéptidos más grandes a través de poros formados de la unión de proteínas de adhesión entre las membranas de las células por medio de difusión pasiva. Un ejemplo de estas proteínas son la ocludina y claudina (proteínas componentes de las zonas de oclusión celular) (Shimizu, 1997). Este tipo de vía es no digestiva, sin embargo se considera que desempeña un papel importante en la absorción de péptidos bioactivos en forma intacta. Se ha especulado que el mecanismo mediante el cual la BCM-7 bovina ingresa a circulación general es por medio de la absorción paracelular intestinal (Wada, 2014).

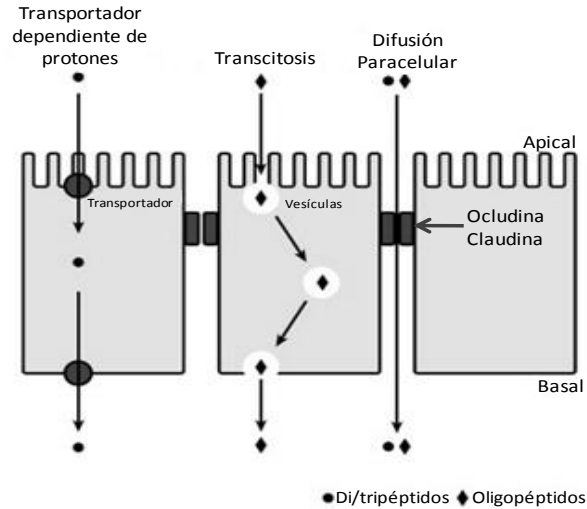


Figura 2. Transporte de di/tripéptidos y oligopéptidos a través del enterocito al torrente sanguíneo. Adaptada de Wada, 2014

Los precursores de BCM no sólo resisten la digestión total, sino que también liberan cantidades considerables de BCM durante el curso de la absorción intestinal y circulación sanguínea (Wada, 2014).

Un estudio realizado en adultos por Svedberg y colaboradores (1985), encontraron cantidades de material inmunoreactivo de BCM-7 bovina en intestino de personas adultas después de ingerir un litro de leche, también encontraron en menor cantidad BCM-4 y 6, y no se encontró BCM-5.

2.5 BCM-7 en leche materna

BCM-7 bovina no debería estar presente en leche materna debido a que la variante de la caseína es de tipo A2, sin embargo se han realizado investigaciones que demuestran la presencia de BCM-7 bovina en leche materna (Tabla 3).

Tabla 3. Estudios que confirman la presencia de BCM-7 en leche materna.

Estudio	Objetivo	Resultado
Jarmolowska, <i>et al</i> , 2007	Determinar el contenido de BCM-7 en la leche humana en distintas fases de la lactancia, en mujeres lactantes sanas	El contenido de BCM-7 en el calostro fue ocho veces mayor para BCM-7 (3.10 µg/ml) que en la leche madura del segundo y cuarto mes de lactancia (0.39 µg/ml, 0.33 µg/ml respectivamente).
Sidor <i>et al.</i> , 2008	Determinar concentración de BCM-7 en leche materna en mujeres con historial de alergia vs. grupo control mujeres sanas	La concentración de BCM-7 se mantuvo estable en el grupo de mujeres alérgicas durante el periodo de lactancia (calostro: 1.67µg/ml, leche madura: 1.26 µg/ml). En el grupo control disminuyó conforme avanzó el periodo de lactancia (calostro: 3.10 µg/mL, leche madura: 0.39 µg/mL). La concentración de BCM-7 fue mayor en calostro que en leche madura en ambos grupos
Álvarez <i>et al.</i> 2014	Demostrar la liberación de BCM-7 durante la digestión gastrointestinal simulada, en muestras de leche materna, leche de vaca Jersey genotipificada como A2/A2, leche de vaca Holstein y fórmulas infantiles	Leche materna digerida, mostró una concentración de BCM-7 de 3.14 ± 0.10 nmol/100 mL. Podría ser posible, que la BCM-7 encontrada y cuantificada estuviera presente en la muestra previa a la hidrólisis enzimática.

2.6 BCM-7 en Sangre

Varios estudios han mostrado la presencia de BCM-7 en plasma en humanos (Tabla 4).

Tabla 4. Estudios que confirman la presencia de BCM-7 en plasma

Estudio	Objetivo	Resultado
Teschemacher <i>et al.</i> , 1986	Examinar la absorción gastrointestinal de BCM en muestras de sangre obtenidas de personas que ingirieron leche de vaca o derivados	No se detectó material inmunoreactivo contra BCM-7 en plasma en un periodo de 30 a 120 minutos después de la ingestión de leche de vaca o derivados. La cantidad mínima detectable de BCM en plasma fue entre 0-2 pmol/mL.
Kost <i>et al.</i> , 2009	Detectar BCM-7 humana y bovina en plasma sanguíneo de lactantes alimentados al seno materno y con fórmula infantil y su relación entre el nivel de BCM-7 y el índice de desarrollo psicomotor.	La concentración de de BCM-7 bovina encontrada después de la ingestión de fórmula infantil fue 180 fmol/mL en niños de 1-3 meses, 100 fmol/mL 4-6 meses y 190 fmol/ml en niños de 7-10 meses. Se encontró BCM-7 humana con valores de 350 fmol/mL en niños de 1-3 meses y 150 fmol/mL en el rango de 4-10 meses. El nivel basal de BCM-7 bovina aumentó 2 veces en el plasma sanguíneo en niños que mostraron retraso en el desarrollo.
Wasilewska <i>et al.</i> , 2011	Identificar la presencia de BCM-7 bovina en la sangre de lactantes alimentados al seno materno	Se encontró BCM-7 en sangre de los lactantes en una concentración de 4 pmol/ml. Ninguna de las madres que participaron aplicó alguna dieta de eliminación y consumo de leche y/o derivados. Es de esperar que la BCM-7 haya sido transferida del aparato digestivo de las madres a su circulación sanguínea y finalmente a la leche producida en la glándula mamaria y consumida por los lactantes.

La importancia de encontrar BCM-7 en leche humana radica la posible participación en la etiología de algunas enfermedades que han sido estudiadas en los últimos años, tanto en adultos, en niños y en lactantes, como lo es muerte súbita del lactante, autismo, esquizofrenia, diabetes mellitus insulino dependiente, pseudoalergias entre otras..

2.7 BCM-7 y su posible participación en alteraciones patológicas

Existe poca información disponible en la literatura en relación con la cantidad mínima de BCM-7 capaz de ejercer efectos fisiológicos in vivo o ex vivo (De Noni, 2008). Jarmolowska *et al.*, (1999) utilizando una solución de 0.5 mgcm^{-3} del extracto del péptido BCM-7 obtenido del queso brie, fue suficiente para causar contracciones en intestino provenientes de híbridos de conejo. De Noni (2008) encontró que cantidades 200 a 400 veces más bajas de BCM-7 pueden estar presentes en el intestino del lactante después de la digestión de 800 ml de una fórmula infantil comercial. Sin embargo no se han realizado investigaciones relacionado BCM-7 y su efecto en la salud.

2.7.1. Diabetes Mellitus Tipo 1

Un estudio realizado in vitro, por Elitsur *et al.* (1991) en muestras de colon e intestino humano, demostraron que BCM-7 inhibe la concanavalina A, que es una lectina procedente del frijol y es utilizada para inducir mitosis de linfocitos en estudios in vitro, ya que estimula la síntesis del DNA de la lámina propia de linfocitos (zona comprendida entre el epitelio y la mucosa, contiene células plasmáticas maduras productoras de IgA, linfocitos T y otros tipos celulares como macrófagos, células dendríticas y mastocitos) (Ramiro-Puig, 2008).

Estos resultados sugieren que BCM puede afectar la mucosa humana del sistema inmune, probablemente por la vía del receptor opioide (Elitsur, 1991). Este efecto inmunosupresor podría influir o suprimir mecanismos de defensas hacia enterovirus que podrían conducir a la destrucción de las células beta a través de la activación sistémica de las células T autorreactivas (Conrad, 1997).

2.7.2. Síndrome de muerte súbita del infante

Un factor común en todos los niños que desarrollaron síndrome de muerte súbita, fue el consumo de leche, como única fuente de alimento. La formación de pequeños péptidos obtenidos de la degradación de la bCSN por acción de enzimas gástricas, son absorbidas debido a la inmadurez intestinal, alcanzando la barrera hematoencefálica. En lactantes con control anormal respiratorio y desarrollo del nervio vago, los péptidos opioides pueden inducir depresión del centro respiratorio ubicado en el bulbo raquídeo, ocasionando la muerte. La formación de péptidos a partir de bCSN son considerados como un factor que contribuye a la incidencia de apnea y síndrome de muerte súbita (Sun *et al.*, 2003)

Wasilewska *et al.*, (2011) investigaron la relación de BCM-7 y la enzima DPP IV en suero de lactantes. Los niños que presentaron algún evento de apnea, se relacionaba con una disminución de DPP IV, por lo que una baja actividad de esta enzima podría ser responsable de la depresión respiratoria inducida por la BCM7 y puede provocar la muerte súbita de lactante.

2.7.3. Autismo – Esquizofrenia

Whiteley *et al.* (2003) demostró que los péptidos con actividad opioide derivados de la bCSN (BCM-7), atraviesan la membrana intestinal anormalmente permeable e ingresan al sistema nervioso central, ejerciendo efecto sobre la neurotransmisión, alterando procesos fisiológicos tales como la concentración, alteración en la percepción del dolor, coordinación motora (Whiteley *et al.*, 1999).

Con base en un estudio de Sokolov *et al.*, (2014), en el que encontró concentraciones de BCM-7 en orina en niños sanos de 58 ± 7 pg/mL, en la de niños con síndrome Asperger de 75 ± 10 pg/mL y de 104 ± 10 pg/mL en la de niños con síndrome de Kanner, se estableció que los niños con autismo tienen elevado el nivel BCM-7 en orina, además de existir una correlación positiva entre el contenido de BCM-7 y la gravedad de los trastornos de espectro autista.

Una hipótesis establecida por Ganapathy *et al.*, (2005), refiere que BCM-7 tiene la capacidad de permear de la circulación general hacia el sistema nervioso periférico por medio del sistema de transporte de encefalina y dinorfina, activando una serie de reacciones en áreas cerebrales específicas, contribuyendo en la etiología del autismo.

Estudios epidemiológicos realizados por Reichelt *et al.*, (1996) y Sun *et al.*, (2003) han relacionado el consumo de bCSN A1 con el desarrollo de esquizofrenia. Dichos autores establecen que la BCM-7 cruza la mucosa gastrointestinal, ingresa al sistema circulatorio y atraviesa la barrera hematoencefálica ejerciendo una influencia negativa en el funcionamiento neurológico.

2.7.4. Enfermedades Cardiovasculares

En un estudio realizado por McLachlan (2001), se estimó la ingesta de productos y proteínas lácteas de diversos países y regiones. Se observó una correlación positiva entre la estimación del consumo de proteína de la leche bovina (BCN A1) y la mortalidad por cardiopatía isquémica ($r= 0.86$) en hombres en un rango de edad de 30 a 69 años. Tailfordy *et al.*, (2003) realizaron un estudio en conejos alimentados con dietas que contenían las variantes de BCN A1 y A2, encontraron estrías de grasa aórtica en todos los modelos animales, independiente del tipo de BCN con los que fueron alimentados, sin embargo, los conejos que consumieron BCN de tipo A1 producían lesiones más extensas comparados con los alimentados con BCN A2, por lo que concluyeron que la BCN A1 es más aterogénica que la variante de tipo A2.

El mecanismo propuesto menciona que los péptidos derivados de BCN con terminaciones tirosil, como lo es BCM-7 bovina, puede promover la oxidación peroxidasa dependiente de LDL humana, por lo que la terminación tirosil puede ser un catalizador difusible que potencialice la oxidación de lípidos LDL (Torreilles *et al.*, 1995).

2.8 Leche Materna

2.8.1 Composición

La composición de la leche materna se distingue por ser altamente variable: varía en cada persona, entre poblaciones, cambia su composición de una toma a otra, y de un día para otro. También está influenciada por la etapa de la gestación y lactancia (Titi *et al.*, 2014).

2.8.2 Clasificación

Se distinguen tres variantes de la leche materna: calostro, leche de transición y leche madura. Algunos estudios han investigado la influencia del contenido de grasa, ya que es el componente principal de la energía y el componente más variable de la leche materna (Khan *et al.*, 2013).

2.8.2.1 Calostro

Se produce los primeros 4 días después del parto, es un líquido amarillento por la presencia de beta-carotenos, tiene una alta densidad por la elevada concentración de sólidos. Se produce en bajas cantidades, contiene una alta concentración de componentes inmunológicos como inmunoglobulina A secretora (IgA), lactoferrina, leucocitos y factores de desarrollo, como el factor de crecimiento epidérmico. Presenta concentraciones relativamente bajas de lactosa, lo que indica sus funciones primarias para ser inmunológica y trófico más que nutricional. Los niveles de sodio, cloro y magnesio son más altos y los niveles de potasio y de calcio son más bajos en el calostro que en la leche madura. (Ballard *et al.*, 2013).

2.8.2.2 Leche de transición

La leche de transición mantiene algunas características propias del calostro, representa un período de incremento en la producción de leche (700 mL/día aproximadamente) por lo general se produce a partir del día 5 hasta 2 semanas después del parto (Shellhorn *et al.*, 1995).

2.8.2.3 Leche de madura

La composición media de la leche madura se resume en la tabla número 2. Las estimaciones de energía varían entre 65 y 70 kcal/100 mL, está altamente

correlacionada con el contenido de grasa de la leche humana (Ballard *et al.*, 2013).

Tabla No. 5 Contenido nutrimental de leche materna madura por 100 ml

Energía	65 - 70 kcal
Lactosa	6.7 – 7.8 g
Proteínas totales	0.8 – 1.2 g
Caseína	0.25 g
Lactoalbúmina	0.26 g
Lactoferrina	0.17 g
IgA	0.14 g
Grasa total	3.2 – 3.6 g

Adaptada de Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors

Las proteínas de la leche humana se pueden clasificar en 2 grupos: caseínas, y proteínas de suero de leche. Las proteínas más abundantes son caseína, α -lactoalbúmina, lactoferrina, inmunoglobulina IgA secretora, lisozima, y albúmina de suero. Los compuestos nitrogenados no proteicos comprenden aproximadamente el 25% de nitrógeno en la leche humana, dentro de estos se incluyen; urea, el ácido úrico, creatina, creatinina, aminoácidos y nucleótidos (Macías *et al.*, 2006).

2.9 PROTEÍNAS EN LA LECHE MATERNA

El contenido de proteína de la leche humana disminuye rápidamente durante el primer mes de lactancia. La concentración de proteína en el calostro es de aproximadamente 2 g de proteína/100 mL, mientras que en la leche materna madura es de 0.8 a 0.9 g/100 mL. La mayoría de las proteínas son sintetizadas por la glándula mamaria, con unas pocas excepciones posibles, como albúmina de suero que aparece a partir de la circulación materna (Lönnerdal *et al.*, 1976). Las mucinas, también conocidas como proteínas de membrana del glóbulo de grasa de la leche, rodean los glóbulos de lípidos en la leche y contribuyen sólo un pequeño porcentaje del contenido total de proteínas de la leche humana (Patto *et al.*, 1986).

La concentración de proteínas de suero es muy alta en comparación con las caseínas, que son prácticamente indetectables durante los primeros días de lactancia. Posteriormente, la síntesis y concentración de caseínas en la glándula mamaria aumentan, mientras que la concentración de proteínas totales del suero disminuye, debido a un mayor volumen de leche producida. Como consecuencia, no hay relación fija de suero a caseína en la leche humana. La relación frecuentemente citada de 60:40 es una aproximación de la relación en el curso normal de la lactancia, pero varía de 80: 20 en la lactancia temprana a 50:50 en el final de la lactancia. Debido a que las composiciones de aminoácidos de las caseínas y proteínas del suero son diferentes, el contenido de aminoácidos de la leche humana también varía durante la lactancia (Lönnerdal *et al.*, 1985).

2.9.1 Caseína

La caseína en la leche humana, parece estar presente casi exclusivamente en forma micelar. La caseína no es una sola entidad, es un grupo de subunidades de proteínas, asociadas y unidas entre sí, con los iones orgánicos e inorgánicos en las micelas. En la leche humana, la subunidad principal es la bCSN, mientras kapa-caseína es un componente menor. La leche de vaca, sin embargo, contiene una gran proporción de alfa-caseína una subunidad aparentemente ausente en la leche humana (Lönnerdal *et al.*, 1985).

2.9.2 Beta-caseína

La bCSN constituye alrededor del 30-35% de la caseína total en leche materna madura, siendo la caseína más abundante. A nivel molecular, la caseína humana y bovina difieren significativamente, en el estado de fosforilación. La beta-caseína humana presenta de 0-5 fosforilaciones en los aminoácidos serina y treonina que están localizados cerca del N-terminal, los cuales son capaces de unir principalmente al calcio así como otros cationes, los aminoácidos que pueden estar fosforilados son: Thr 3, Ser 6, Ser 8, Ser 9 y Ser 10. Por otro lado el homólogo bovino se encuentra totalmente fosforilada. El número de fosfatos que contiene cada proteína sigue siendo poco claro, una posible explicación incluye a la actividad de las enzimas cinasa o fosfatasa durante la biosíntesis en cada

especie. La bCSN humana contiene 212 residuos de aminoácidos (peso molecular de 24 kDa) (Greenberg *et al.*, 1984). Durante el proceso digestivo de bCSN humana, permite la formación de fosfopéptidos que contiene calcio soluble, lo cual facilita su absorción (Sato *et al.*, 1986).

2.9.3 Beta-caseína humana

A partir de la hidrólisis de la caseína humana, particularmente de bCSN se generan varios péptidos con actividad fisiológica. La mayoría de estos péptidos se han generado en ensayos *in vitro*, pero algunos han sido aislados de los contenidos intestinales, lo que sugiere que también se forman *in vivo*. Estos péptidos han demostrado en sistemas experimentales efectos antitrombóticos, antihipertensivos, y actividad opioides (Brantl *et al.*, 1984).

III. Justificación

Existe poca evidencia científica que demuestre la presencia de BCM-7 bovina en muestras de leche materna.

Las investigaciones que se han desarrollado no han analizado el factor de la dieta, principalmente el consumo de lácteos como precursor de la síntesis de BCM-7 a nivel intestinal, la cual se puede transportada a la leche materna y ser consumida por los lactantes.

Las pocas investigaciones realizadas utilizan el término BCM-7 con un concepto genérico sin hacer distinción entre el origen del péptido, si este es endógeno o producido por el cuerpo o exógeno proveniente de la dieta.

La importancia de realizar esta investigación, radica principalmente en que BCM-7 bovina se ha asociado a la etiología de enfermedades que afectan a los lactantes como es autismo, diabetes mellitus insulino dependiente, síndrome de muerte súbita del lactante, pseudoalergias, así como enfermedades en la edad adulta como enfermedades cardiovasculares, esquizofrenia.

IV. Hipótesis

La presencia y concentración de BCM-7 leche materna depende del consumo de lácteos en mujeres en periodo de lactancia.

V. Objetivos

5.1 Objetivo General

Determinar la asociación entre la ingestión de lácteos y la presencia de BCM-7 en leche materna madura en mujeres Queretanas.

5.2 Objetivos Específicos

- Cuantificar la concentración de BCM-7 en muestras de leche materna madura en mujeres.
- Evaluar la relación de la ingestión de productos lácteos en la concentración de BCM-7 en leche materna.
- Determinar el perfil de proteínas en las muestras de leche materna.
- Realizar la secuenciación de la beta caseína humana en las muestras de leche materna que permitan identificar posibles variantes genéticas.

6. Materiales y Métodos

6.1 Sujetos y consideraciones éticas

Se invitó a participar en el estudio a mujeres en periodo de lactancia de entre 15 días y 20 semanas después del parto, que hayan tenido un parto a término, es decir, un periodo de gestación de 37 a 40 semanas, y que se encontraran en un rango de edad de 18 a 35 años. Las mujeres se reclutaron de 8 comunidades del Municipio del Marqués, Querétaro.

La participación fue totalmente voluntaria. Las mujeres que aceptaron participar en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado, donde se presentaba por escrito los procedimientos del estudio, posibles riesgos y beneficios. A todas las participantes se les realizó una evaluación de antecedentes clínicos, para determinar si cumplían con los criterios de inclusión, y poder detectar criterios de exclusión y/o eliminación. También se realizó una evaluación antropométrica; que consistió en la obtención del peso y talla por duplicado, evaluación dietética; se aplicaron 3 recordatorios alimentos de 24 horas, dos entre semana y uno de fin de semana, así como una frecuencia de alimentos, esta información permitió conocer principalmente patrones de consumo de productos lácteos. También se aplicó un cuestionario socioeconómico que permitió evaluar aspectos sobre el contexto sociodemográfico y académico de las participantes, así como aspectos relacionados con las condiciones de la vivienda, hacinamiento, propiedad de la vivienda, escolaridad y ocupación de las participantes.

El estudio fue sometido al Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se siguieron los lineamientos éticos establecidos en la Declaración de Helsinki, las Buenas Prácticas Clínicas y la Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria.

6.1.1 Tamaño de la muestra

Se conformó una muestra de 78 mujeres, que fueron incluidas después de firmar la carta de consentimiento informado. El tamaño de la muestra fue calculado considerando un error alfa de 0.05, con un error estadístico de 0.8 y una desviación estándar de 33% en la concentración de BCM-7 en leche materna reportado previamente en la literatura, se consideró un 20% de deserción. Con estas consideraciones, se pretendió detectar una diferencia entre el bajo y alto consumo de lácteos según el valor de la mediana, en la concentración de BCM-7 en leche materna madura.

6.1.2 Criterios de inclusión

Se incluyeron a las mujeres en periodo de lactancia que cumplieron con los siguientes criterios:

- La participante firmó la carta de consentimiento informado.
- Se encontraba en periodo de lactancia, mayor a 15 días y hasta 20 semanas después del parto.
- Que haya tenido un parto a término (37- 40 semanas).
- Que tuviera disposición a participar en el estudio de acuerdo a lo establecido en la Carta de Consentimiento Informado.

6.1.3 Criterios de exclusión

Se excluyeron del estudio mujeres que presentaron alguna de las siguientes características:

- Que haya tenido un parto prematuro (menor a 37 semanas de gestación).
- Más de 21 semanas de lactancia.
- Que la participante presentara una discapacidad física y/o malformación que le impidiera la extracción de la leche materna manual.
- Que la participante presentara enfermedades infecciosas como VIH, tuberculosis.

6.1.4 Criterios de eliminación

Se dieron de baja a las participantes que presentaron alguno de los siguientes criterios.

- Que la participante iniciara con tratamiento médico para detener la producción de leche (bromocriptina, estrógenos, cabergolina).
- Que la participante deseara retirarse del estudio.
- Que la participante no donara muestras de leche materna.

6.2 Diseño del estudio

Se realizó un estudio de tipo observacional transversal.

6.2.1 Procedimientos

Se realizaron mediciones de peso y talla, por personal previamente estandarizado, siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud. Todas las mediciones se hicieron por duplicado.

6.2.2 Talla y peso

La talla se midió con un estadímetro portátil de pared de 2 m con divisiones de 1 mm (SECA, Mod 206, Bradford, MA, EUA). Las mujeres fueron medidas descalzas, con las puntas de los pies ligeramente separadas en V, cabeza erguida, hombros, glúteos talones y cabeza estaban en contacto con el plano vertical, para formar un ángulo de 90°. Para tomar la lectura se deslizó la parte superior del estadímetro y cuando este tocara la parte superior más prominente de la cabeza de la participante se tomó la lectura. La medición se realizó por duplicado.

Las mediciones de peso se realizaron sin zapatos, con una báscula digital (SECA, Mod 813, Brandford, MA, EUA), con la menor cantidad de ropa posible, sin suéter o chamarras y sin objetos pesados, esto fue totalmente con una postura recta, cabeza erguida viendo al frente, los brazos colgaron paralelos al eje del cuerpo sin moverlos. Antes de tomar la lectura se revisó que la participante se encontrara en plano de Frankfurt. Se pidió a las señoras que no se movieran. El

valor de peso se registró en escala de kilogramos con una cifra decimal. Las básculas fueron calibradas con un pesa de 5 kg y dos de 1 kg.

Con las mediciones de peso y talla se calculó el índice de Masa Corporal (IMC), mediante la siguiente expresión matemática:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso en kilogramos}}{(\text{Estatura en metros})^2}$$

Los puntos de corte fueron tomados de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud, bajo peso <18.5 kg/m², normal 18.5 – 24.9 kg/m², sobrepeso 25 – 29.9 kg/m² y obesidad >30 kg/m² (WHO, 2006).

6.3 Instrumentos para la obtención de datos

6.3.1.1 Antecedentes Clínicos

El cuestionario de antecedentes clínicos comprendió aspectos relacionados con las características generales de las participantes como antecedentes heredofamiliares, antecedentes de salud y enfermedad. El cuestionario fue aplicado por un nutriólogo con experiencia laboral en el área clínica.

6.3.1.2 Cuestionario Nivel Socioeconómico

El cuestionario socioeconómico explica las condiciones de la vivienda, condiciones de hacinamiento y propiedad de la vivienda, las cuales son necesarias para la conformación de la variable del nivel socioeconómico. Esta variable es indispensable para el control de variables confusoras durante el análisis estadístico de resultados.

6.3.1.3 Evaluación de la dieta

Se realizaron tres recordatorios de 24 horas de alimentos, dos de días entre semana y uno de fin de semana. La evaluación de la dieta se realizó por nutriólogos previamente estandarizados. Se analizó la distribución de macronutrientes y se calculó el porcentaje de adecuación para ver si cubrían con la ingestión diaria recomendada (IDR) para mujeres en periodo de lactancia (Bourges *et al.*, 2008). Las variables de respuesta fueron la comparación del alto o bajo consumo de productos lácteos. La ingestión de nutrientes se calculó

usando tablas de composición de alimentos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA 2009) y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Chávez *et al.*, 1996).

El recordatorio de 24 horas define y cuantifica todas las comidas y bebidas ingeridas durante el día anterior a la entrevista (primera comida, colaciones y última comida por la noche). Se utiliza para evaluar en forma cuantitativa la dieta de poblaciones. Para conocer la ingestión de alimentos, y en especial el consumo de productos lácteos por las mujeres en periodo de lactancia, el recordatorio fue aplicado utilizando cucharas de diversas medidas así como tazas estándares, para minimizar errores en la cantidad de productos consumidos.

6.3.4 Determinaciones bioquímicas

Los datos de las determinaciones bioquímicas, se obtuvieron a partir de 3 a 5 muestras de leche materna madura (mayor a 15 días después del parto y hasta la semana 20 de lactancia).

La recolección de las muestras de leche fueron realizadas por las propias participantes, para ello recibieron las indicaciones y los materiales. Se obtuvieron muestras de diversos días de la semana, incluyendo una muestra de fin de semana. Las participantes recibieron instrucciones oral y por escrito (por medio de un tríptico) de la técnica adecuada para la extracción manual descrita por UNICEF de 2014.

Las muestras de leche se recolectaron en vasos estériles cerrados de 100 mL, proporcionados por el equipo de investigación.

Se les indicó a las participantes que la leche fuera extraída en la comodidad de su hogar. Una vez extraída la leche, se identificó con el nombre de la participante, fecha y hora de extracción, así como el número de muestra correspondiente, se guardó el envase en el congelador. El equipo de trabajo de campo asistió a las casas de las participantes para recoger las muestras en hielera que contenía gel refrigerante, lo que permitió mantener la leche congelada hasta su traslado al laboratorio de Nutrición Humana de la Universidad Autónoma

de Querétaro, donde se mantuvieron en ultra congelación a -70°C hasta su análisis.

6.3.4.1 Descremado de la leche materna.

Previo a su análisis, la leche (10 mL), fue descremada por medio de centrifugación (4500 g por 20 minutos a temperatura 20°C) en tres ocasiones. El exceso de grasa se retiró de las muestras. De la leche descremada se tomaron alícuotas de 100 μL para el análisis de electroforesis SDS PAGE y secuenciación de proteínas.

6.3.4.2 Extracción del péptido BCM-7

Para el aislamiento del péptido se adaptó la técnica establecida por Jarmolowska *et al.*, (2007). Para esto, la leche materna (10 mL, previamente descremada) fue mezclada con 5 mL de una solución compuesta de metanol/cloroformo (2:1 v/v). Se mantuvo una hora constante en agitación suave. Concluido el tiempo se centrifugó a 5000 g durante 30 minutos.

Posteriormente se extrajo la fase acuosa (5 mL) compuesta de agua/metanol, la cual contenía al péptido, y se colocó en tubos cilíndricos con tapa de 15 mL, la cual fue evaporada y secada hasta la obtención de cristales sólidos. Los cristales fueron depositados en viales de vidrio con tapa y almacenados en ultra congelación a -70°C hasta su análisis.

6.3.4.3 Cuantificación

Los cristales sólidos que contienen a los péptidos fueron purificados usando una columna C18 (AerisPeptideXB-C18, 100 Å, 1.7 μ , Phenomenex). Se pesaron muestras de 150 mg de cristales sólidos que fueron disueltos en 10 mL de agua grado HPLC para obtener una concentración de 1 mg/mL. De la solución se tomó una muestra de 800 μL , se agregó 200 μL de una mezcla de metanol/ácido fórmico al 0.1%.

El análisis fue realizado por sistema espectrométrico de masas acoplado a UPLC (Xevo TQ MS, Waters). Los picos fueron detectados con un método de monitoreo de múltiples reacciones utilizando una transición 790.5 – 383.21. Las

características cuantitativas y cualitativas de BCM-7 bovina, fueron comparadas con el estándar (Sigma-Aldrich, USA).

6.3.4.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Se formó un pool de leche descremada por cada una de las participantes, de la mezcla de leche resultante se tomó 10 µL, que fueron disueltos en 15 µL de agua destilada y 30 µL de buffer de carga de muestra (Tris-HCL 65.8 mM, pH 6.8, SDS 2.1%, glicerol 26.3% W-V, azul de bromofenol 0.1%, 2β-mercaptoetanol) y calentados por 10 minutos. 15 µL de cada solución se cargaron en los pozos del gel de poliacrilamida 4 - 20% (Mini-Protean TGX Precast Gel, Bio-Rad, PA). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de electroforesis vertical (Mini-Protean Tetra CellBio Rad, CA). El voltaje utilizado en el gel separador fue de 120 V durante 120 minutos. Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie, la distribución de las proteínas fue determinada por un equipo de densitometría (Gel Doc EZ Imager, Bio Rad, CA).

6.3.4.6 Secuenciación de bCSN humana

Para determinar la secuenciación de la bCSN humana, a partir del gel de poliacrilamida, se extrajo la banda correspondiente a la proteína cuyo peso molecular es de 20 kDa, la cual fue digerida con termolisina, para la obtención de péptidos de un tamaño similar. Los péptidos fueron analizados en un espectrómetro de masas LTQ-Velos (ThermoScientific), acoplado a un cromatógrafo de alta resolución (HPLC), empleando un gradiente de 60-90 minutos. La identificación de los péptidos se realizó mediante el software SEQUEST HT (Proteome Discoverer 1.4, ThermoScientific)

6.3.5 Análisis Estadístico

Se realizó el análisis estadísticos de las variables que componen la evaluación antropométrica, bioquímica, clínica, sociodemográfica, que permiten conocer las características generales de la población, se reportaron con la media y desviación estándar.

Se realizó un análisis de varianza, para conocer si la concentración de BCM-7 bovina en leche materna, dependía del alto o bajo consumo de productos lácteos y proteínas lácteas. Se realizó una regresión logística para conocer, la probabilidad de aumentar la concentración de BCM-7 bovina en leche materna respecto a un mayor consumo de proteínas lácteas.

Todos los análisis fueron desarrollados con todas las participantes que concluyeron en forma el estudio.

Las pruebas estadísticas fueron realizadas con el paquete estadístico SPSS v. 22.

VII. Resultados

7.1 Características de la población

Se invitó a participar en el estudio a 119 mujeres en periodo de lactancia mayor a 15 días y hasta 20 semanas después del parto, de las cuales 91 firmaron la carta de consentimiento informado y solamente 78 concluyeron satisfactoriamente las evaluaciones correspondientes (Figura 3).

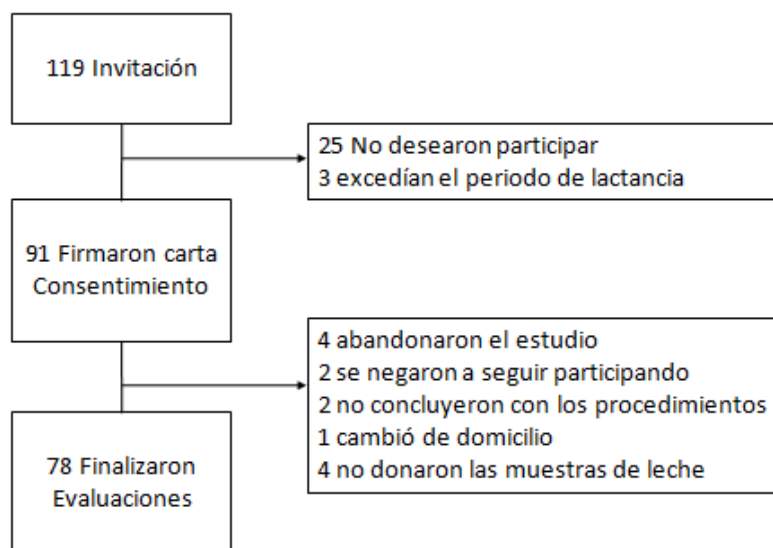


Figura 3. Diagrama de selección de las participantes.

Se eliminaron 13 participantes, debido a que no concluyeron en su totalidad las evaluaciones o porque decidieron darse de baja voluntaria.

Para identificar el periodo de lactancia que se encontraban las participantes, se calcularon los días post parto, utilizando la fecha de nacimiento del lactante y la fecha de aplicación del cuestionario de antecedentes clínicos. Las características generales de las participantes se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Características generales de las participantes (n= 78)

Características	x ± DE ¹	f (%) ²
Edad (años)	22.9 ± 5.38	
Peso (Kg)	61.69 ± 10.08	
Talla (cm)	153.43 ± 5.12	
IMC (Kg/m2)	26.20 ± 4.11	
Nivel de educación		
Sin estudios		2.4
Primaria incompleta		4.9
Primaria completa		19.5
Secundaria incompleta		2.4
Secundaria completa		51.2
Bachillerato incompleta		12.2
Bachillerato completo		1.2
Universitaria		3.7
Maestría		2.4
Ocupación		
Ama de casa		88.0
Empleada		4.8
Profesionista		3.6
Estudiante		1.2
Otra		2.4
Estatus marital		
Casada		32.9
Soltera		7.3
Unión libre		59.8
Periodo de lactancia (días post parto)		
15 – 30		52.1
31 - 60		11.3
61 – 90		14.1
91 - 120		12.7
121 – 140		9.9

¹ x ± DE: media ± desviación estándar

² f(%): frecuencia (porcentaje)

La edad promedio de las mujeres que participaron en el estudio fue de 22.9 \pm 5.38 años. Con respecto al nivel de educación de las participantes del estudio, se encontró que el 51.2% de las mujeres había completado la educación secundaria, su ocupación principal era ama de casa (88%). El 59.8% de ellas vivía en unión libre.

La prevalencia de sobrepeso y obesidad combinada en la población es del 55.9%, mientras que sólo el 41.6% de las participantes, tiene un peso adecuado para su talla (figura 4). Cabe mencionar que el peso que presentaban las mujeres, está condicionado al periodo fisiológico que se encontraban, ya que podían estar reteniendo líquidos, presentar inflamación, por lo que el peso, sólo fue considerado para poder conocer las características generales de la población.

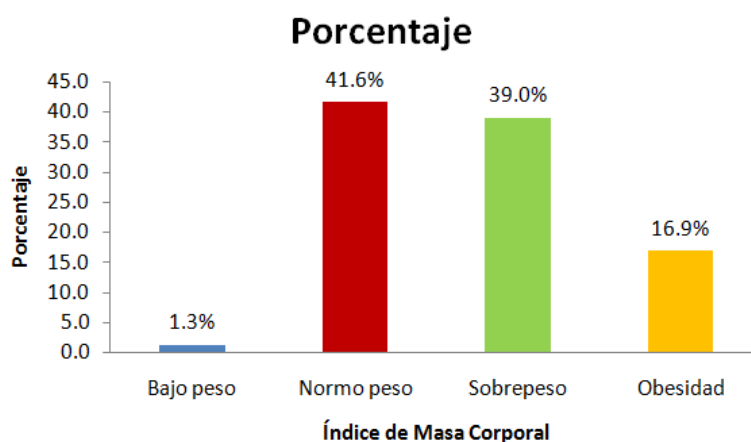


Figura 4. Distribución porcentual del índice de Masa Corporal (IMC) en mujeres en periodo de lactancia (n=78)

7.2 Cuantificación de BCM-7 bovina en leche materna

Se analizaron un total de 268 muestras de leche materna, para determinar la concentración de BCM-7 bovina. El péptido bovino fue detectable en el 64.9% de las muestras, utilizando un límite inferior de cuantificación de 0.25ng/mL y un límite superior de 25ng/mL. Se utilizaron muestras control para monitorear la corrida analítica, con concentraciones baja (0.750 ng/mL), media (12.50 ng/mL) y alta (18.50 ng/mL).

Se realizó una curva de calibración con el estándar de sigma para BCM-7 bovina en 7 concentraciones diferentes. El estándar del péptido presentó un tiempo de retención promedio de 2.81 ± 0.03 minutos, como se muestra en el siguiente cromatograma (figura 5), que corresponde a la concentración teórica de 0.250 ng/mL, el cual presentó un tiempo de retención de 2.82 minutos, además de una masa carga de 790.5.

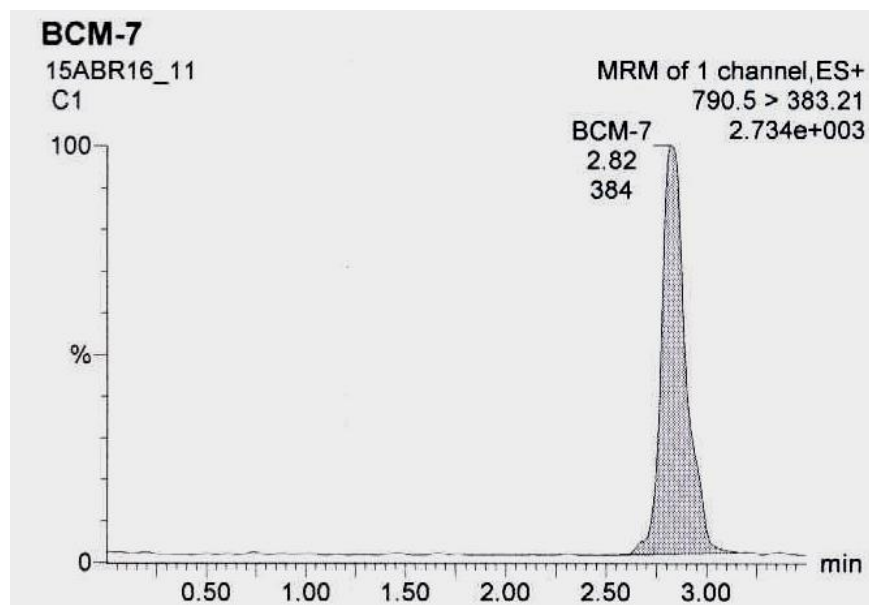


Figura 5. Cromatograma de la determinación de BCM-7 bovina en leche materna

El valor máximo obtenido de BCM-7 bovina en muestras de leche materna fue de 9.27ng/mL y el valor mínimo cuantificable fue de 0.25 ng/mL, con una concentración media de $0.84 \text{ ng/mL} \pm 1.01$. Estos valores encontrados en las muestras analizadas, difieren con resultados reportados por Jarmolowska *et al.*, 2007, donde la concentración máxima detectada fue de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ y el mínimo de 0 $\mu\text{g/ml}$, así como una media de $0.39 \mu\text{g/mL} \pm 0.07$.

En un 35% de las muestras no fue posible cuantificar el péptido, esto puede ser debido a que esas muestras contenían concentraciones de BCM-7 bovina por debajo del límite de detección ó por la ausencia del péptido.

Se realizó una ANOVA para determinar si existía diferencia entre las concentraciones medias de BCM-7 bovina y el periodo de lactancia en el cual las

muestras fueron obtenidas por cada participante. Las categorías se establecieron como se muestra en la figura 6. El resultado obtenido del análisis demuestra que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.096$) entre las concentraciones de BCM-7 bovina y los diferentes periodos de lactancia establecidos.

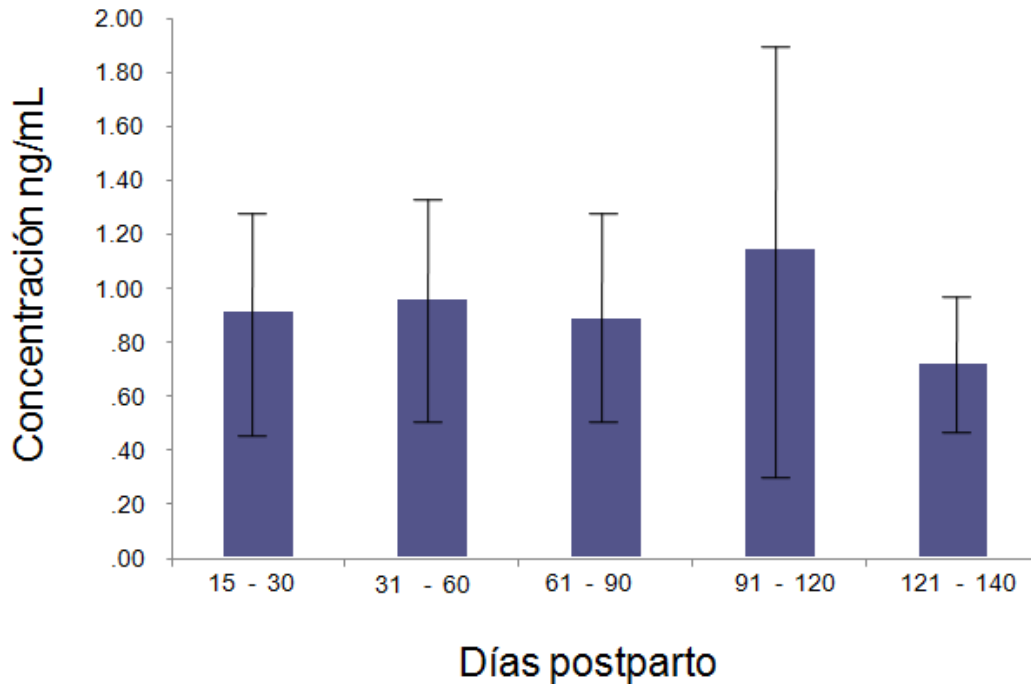


Figura 13. Contenido de BCM-7 bovina (ng/mL) en leche materna de acuerdo a los días post parto ($p = 0.096$)

Para conocer si existía diferencia en la concentración media de BCM-7 bovina y el horario en el que las muestras fueron extraídas (mañana, tarde ó noche) se realizó una ANOVA, que dio como resultado una $p= 0.352$, por lo que no existió una diferencia estadísticamente significativa de la concentración del péptido con respecto al horario (Figura 7). Sin embargo, se puede observar que existe una mayor tendencia a presentar mayor concentración de BCM-7 bovina en las muestras que fueron obtenidas en el horario matutino con respecto al resto de los horarios.

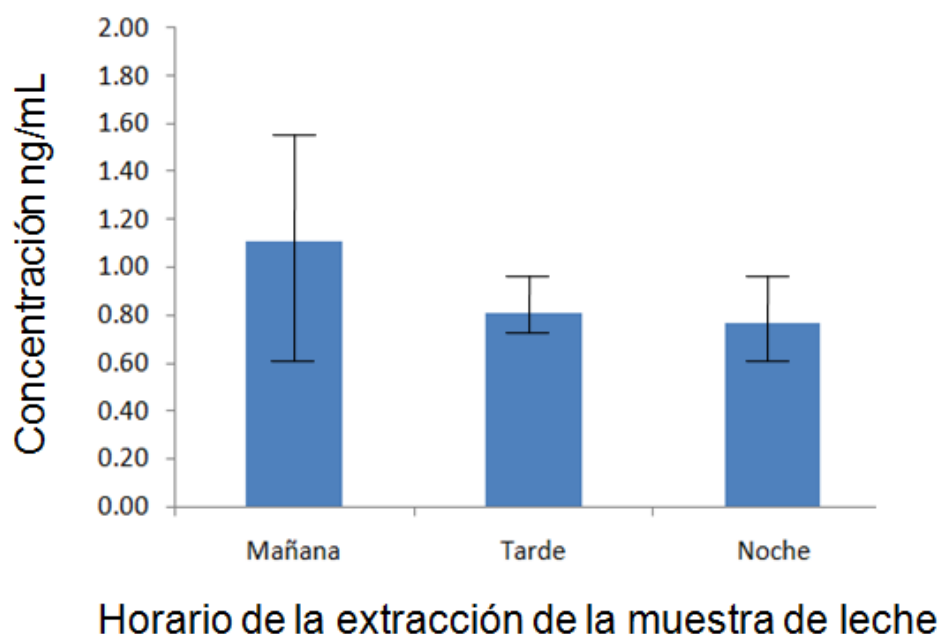


Figura 14. Concentración de BCM-7 bovina (ng/ml) y horario de extracción de la muestra de leche ($p = 0.352$)

7.3 Ingestión de productos lácteos y su asociación con la presencia de BCM-7 bovina en leche materna

7.3.1 Evaluación dietética

Para estimar la recomendación de colesterol se consideraron 125 mg por cada 1000 kcal. Las grasas saturadas representan el 5% de las grasas totales, mientras que las grasas poliinsaturadas el 7%. El valor en gramos de las grasas monoinsaturadas se obtuvo por la diferencia del total de gramos de grasa por día. La información detallada del valor calórico total de macronutrientes que conformó la dieta de las mujeres participantes, se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Distribución de macronutrientos en la dieta de mujeres participantes

Nutrimiento	Unidades	Media	Desviación estándar	Porcentaje VCT*
Energía	Kcal	1938.45	± 521.31	
Hidratos de carbono	G	275.60	± 86.30	56.55
Proteína	G	68.56	± 21.95	14.14
Grasa	G	63.64	± 23.03	29.54

*VCT: porcentaje del valor calórico total aportado por los macronutrientos

Las recomendaciones diarias de ingesta y los resultados obtenidos del análisis de la dieta se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Ingesta de nutrimentos en mujeres participantes en periodo de lactancia

Nutrimentos	Unidades	IDR* población mexicana	Media	Desviación estándar	
Fibra	g	25 - 30	18.60	±	7.47
Colesterol	mg	287.5	225.06	±	139.82
Saturados	g	3.5	16.20	±	7.64
Monoinsaturados	g	59.1	19.35	±	11.12
Poliinsaturados	g	5.6	7.95	±	4.24
Calcio	mg	1000	1010.10	±	382.69
Hierro	mg	21	15.37	±	12.58
Magnesio	mg	250	171.97	±	91.58
Sodio	mg	2000	2204.65	±	835.88
Potasio	mg	3510	1677.77	±	736.47
Fósforo	mg	700	1254.56	±	533.06
Zinc	mg	16	7.27	±	12.91
Vitamina A	µgER	1100	674.45	±	434.16
Vitamina C	mg	128	71.85	±	59.41
Tiamina	mg	1.2	1.37	±	2.17
Riboflavina	mg	1.3	1.95	±	4.86
Niacina	mg	15	12.42	±	7.74
Piridoxina	mg	1.6	1.31	±	2.20
Folato	mg	650	145.28	±	90.69
Cianocobalamina	µg	2.8	2.70	±	2.90
Vitamina E	mg	17	3.42	±	2.54
Vitamina D	µg	5	30.42	±	50.46

*IDR: ingestión diaria recomendada

El aporte de fibra en la dieta resultó insuficiente, debido a que las mujeres únicamente ingieren en promedio 18.6 gramos al día, siendo la recomendación de 25 a 30 g.

Con respecto a la ingesta de grasas, el 56% de las mujeres presenta un aporte del 25-30% del valor calórico total, mientras que el 29.9% de las mujeres exceden del consumo recomendado de grasa total por día. De las mujeres del estudio el 100%, 72%, 78.7% excede el consumo de grasas saturadas, poliinsaturadas y colesterol respectivamente.

En relación a la ingesta de proteínas, la referencia porcentual establecida es del 15%. La ingesta media de gramos de proteína fue de 68.56 g/día, el cual representó el 14.14% del valor calórico total de la dieta, siendo inferior al recomendado. La ingestión de proteínas lácteas, resultado de los tres recordatorios de 24 horas de alimentos, presentó una media de 35.34 ± 18.77 g, la información detallada se muestra más adelante. El aporte de calcio en la dieta de las mujeres en periodo de lactancia en promedio fue de 1010.10 mg/día, por lo que cubre con la recomendación establecida (1000 mg/día). Con respecto al hierro, se observó que la dieta es insuficiente en este micronutriente, aportando únicamente 15.37 mg/día, siendo la recomendación 21 mg/día.

Las vitaminas que conforman el complejo B, analizadas en la dieta, únicamente la tiamina y riboflavina cubren la ingesta diaria recomendada, por lo que existe una ingesta insuficiente de niacina, piridoxina, folato y cianocobalamina.

La información obtenida de la frecuencia de alimentos se presenta en la figura 8. De forma general, las frutas y verduras, fueron principal grupo de alimentos consumido, representado una proporción del 34% con respecto a la totalidad de los alimentos, mientras que los productos lácteos y derivados corresponden al 8%.

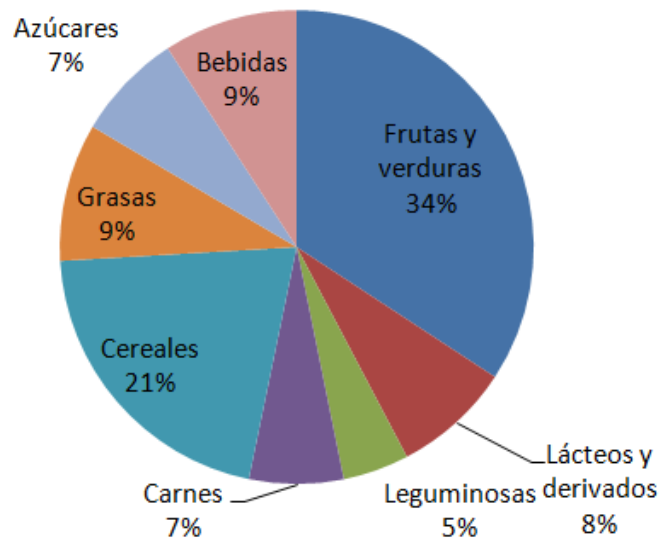


Figura 8. Distribución de grupos de alimentos que conforman la dieta de las participantes

Respecto al consumo de productos lácteos específicamente, el 30.8% de las participantes refirió que ingiere 1 a 2 veces al día algún producto lácteo, siendo este el grupo con mayor número de mujeres que lo integran, mientras que el 11.5% de las mujeres indicó que consume más de 4 raciones de productos lácteos al día (figura 9).

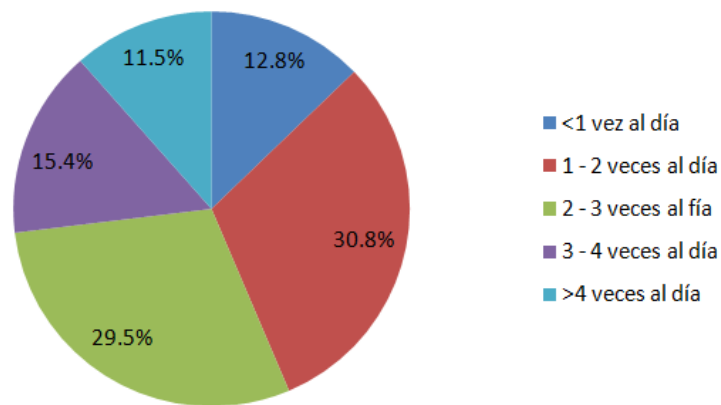


Figura 9. Consumo de raciones de productos lácteos por día

Con respecto al consumo de leche, se encontró que la leche entera es el principal producto que se consume en esta categoría, ya que el 84.8% de las mujeres mencionó que ingiere este alimento, mientras que la leche descremada es

sólo consumida por el 2.5% de las participantes (figura 10). La leche entera es consumida menos de 1 vez al día en un 56.4%, mientras que el 25.6% de las mujeres refirió que consumirla 1 a 2 veces al día.

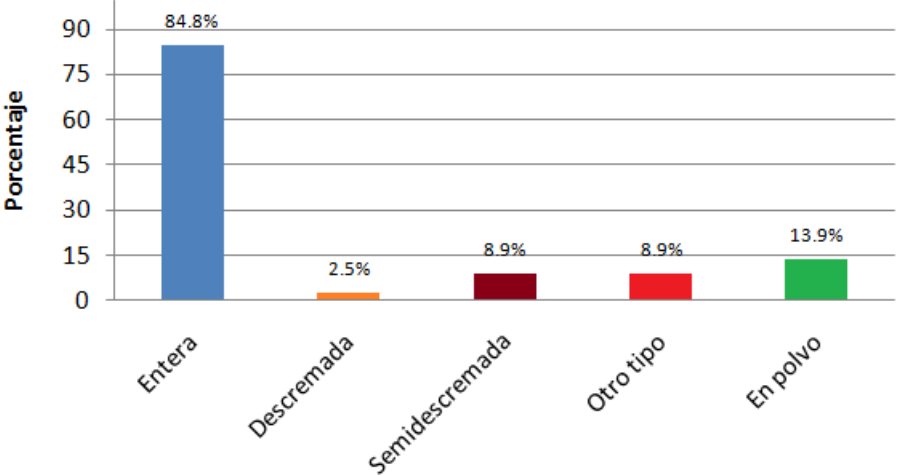


Figura 10. Porcentaje de mujeres que consume diferentes tipos de leche

De las mujeres participantes en el estudio, mencionaron que el queso oaxaca, es el tipo de queso que consumen mayormente (88.6%), seguido por el queso ranchero con el 86.1%. El 27.1% integra una gran cantidad de tipos de quesos, los cuales son consumidos por muy pocas personas (figura 11).

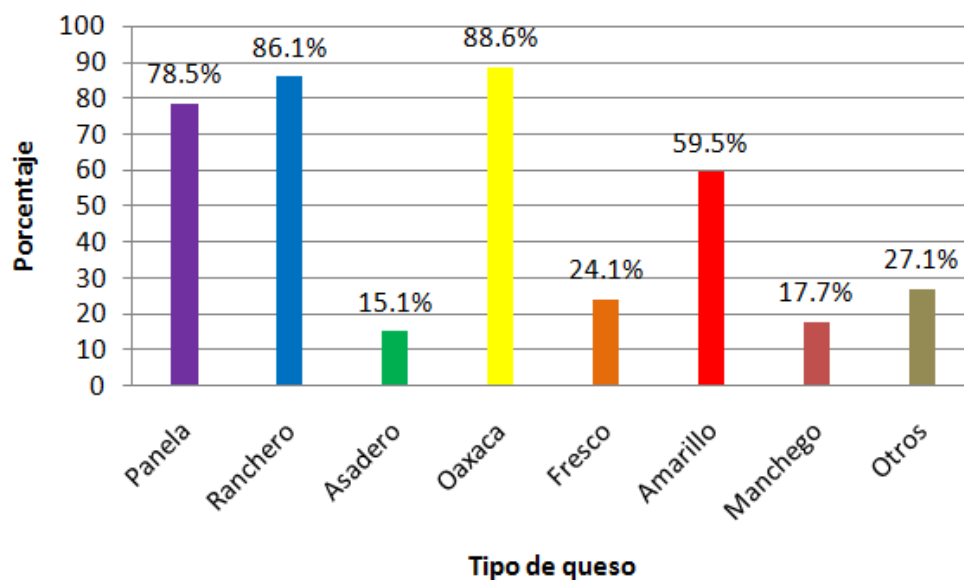


Figura 11. Porcentaje de mujeres que consume diferentes tipos de quesos

El análisis de consumo de productos lácteos, permitió estimar la ingestión de proteínas lácteas, los datos descriptivos se muestran en la tabla 9, los valores que se presentan de los gramos de proteína, corresponde al consumo total obtenido de los tres recordatorios de 24 horas.

Tabla 9. Análisis descriptivo del consumo de proteínas lácteas

Descriptivos	Gramos de proteínas lácteas
Media	35.34
Mediana	32.03
Desviación estándar	18.77
Mínimo	0.00
Máximo	99.43
Percentiles 25	20.75
Percentiles 50	32.03
Percentiles 75	47.10

7.3.2 Asociación del consumo de proteínas lácteas respecto a la concentración de BCM-7 bovina en leche materna

Se realizó una prueba T de student, para determinar si existía diferencia en el consumo de proteínas lácteas y la concentración media de BCM-7 bovina. Se establecieron dos categorías de concentración de BCM-7 bovina, según el valor obtenido de la mediana: alta; mayor a 90 ng/mL y baja; menor a 90 ng/mL.

Hubo diferencia estadísticamente significativa entre el consumo promedio de gramos de proteínas lácteas y las concentraciones bajas y altas de BCM-7 bovina ($p = 0.029$).

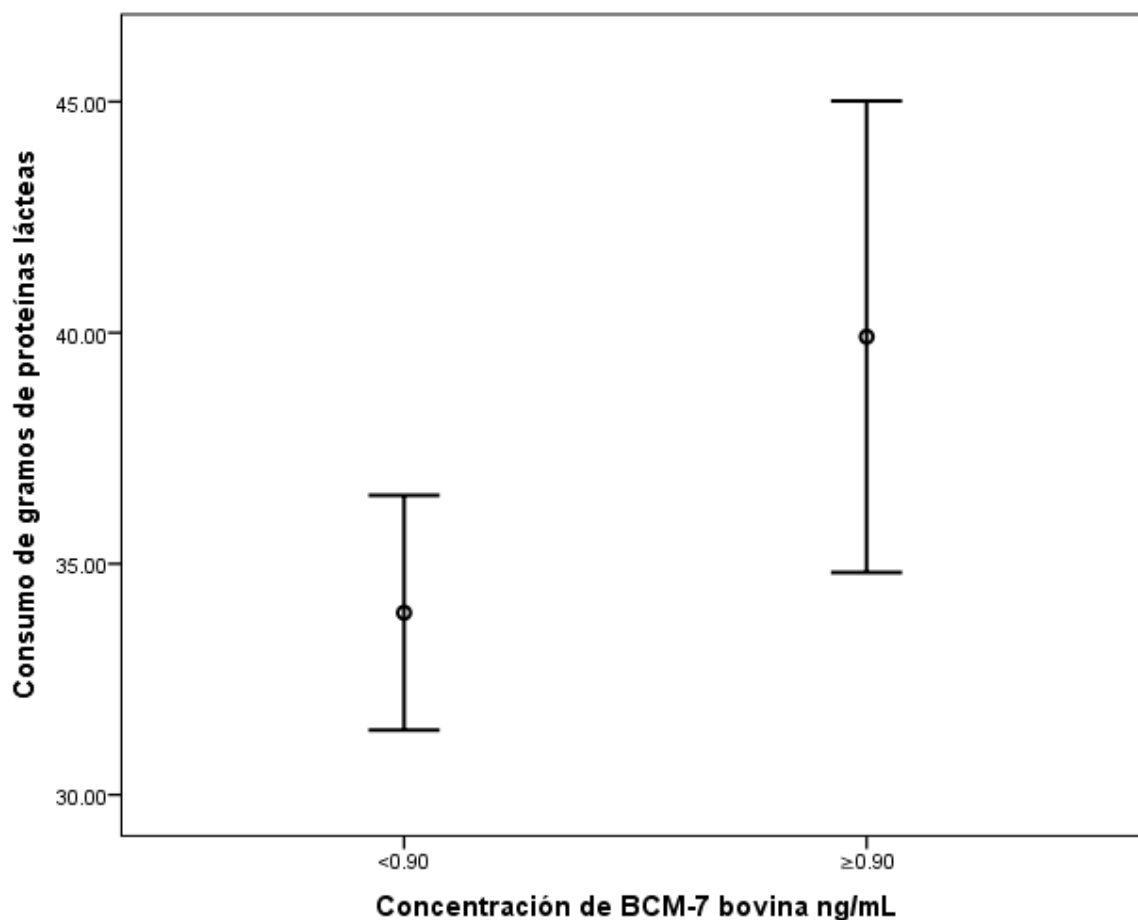


Figura 12. Comparación de las concentraciones medias de BCM-7 bovina y consumo en gramos de proteínas lácteas ($p = 0.029$)

Se realizó una regresión logística para determinar si la concentración de BCM-7 bovina tiene probabilidad de aumentar si se incrementa la ingestión de proteínas lácteas, los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Probabilidad de riesgo de tener un nivel elevado de BCM-7 bovina de acuerdo al consumo de proteínas lácteas por cada 10 gramos

Consumo de proteínas lácteas	Concentración de BCM-7 bovina ng/mL		
	RM*	95% IC	Sig.
Por cada 10 gramos	1.18	1.01, 1.37	0.034

* Razón de momios. El modelo se ajustó por el alto o bajo consumo de de proteínas lácteas.

La regresión logística fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$), por lo que la razón de momios indica cuántas veces más probabilidad tienen las mujeres participantes de tener mayor concentración de BCM-7 bovina por cada 10 gramos de consumo de proteínas lácteas. En la figura 13, se puede observar gráficamente, la probabilidad de aumentar la concentración del péptido con relación al consumo de proteínas lácteas.

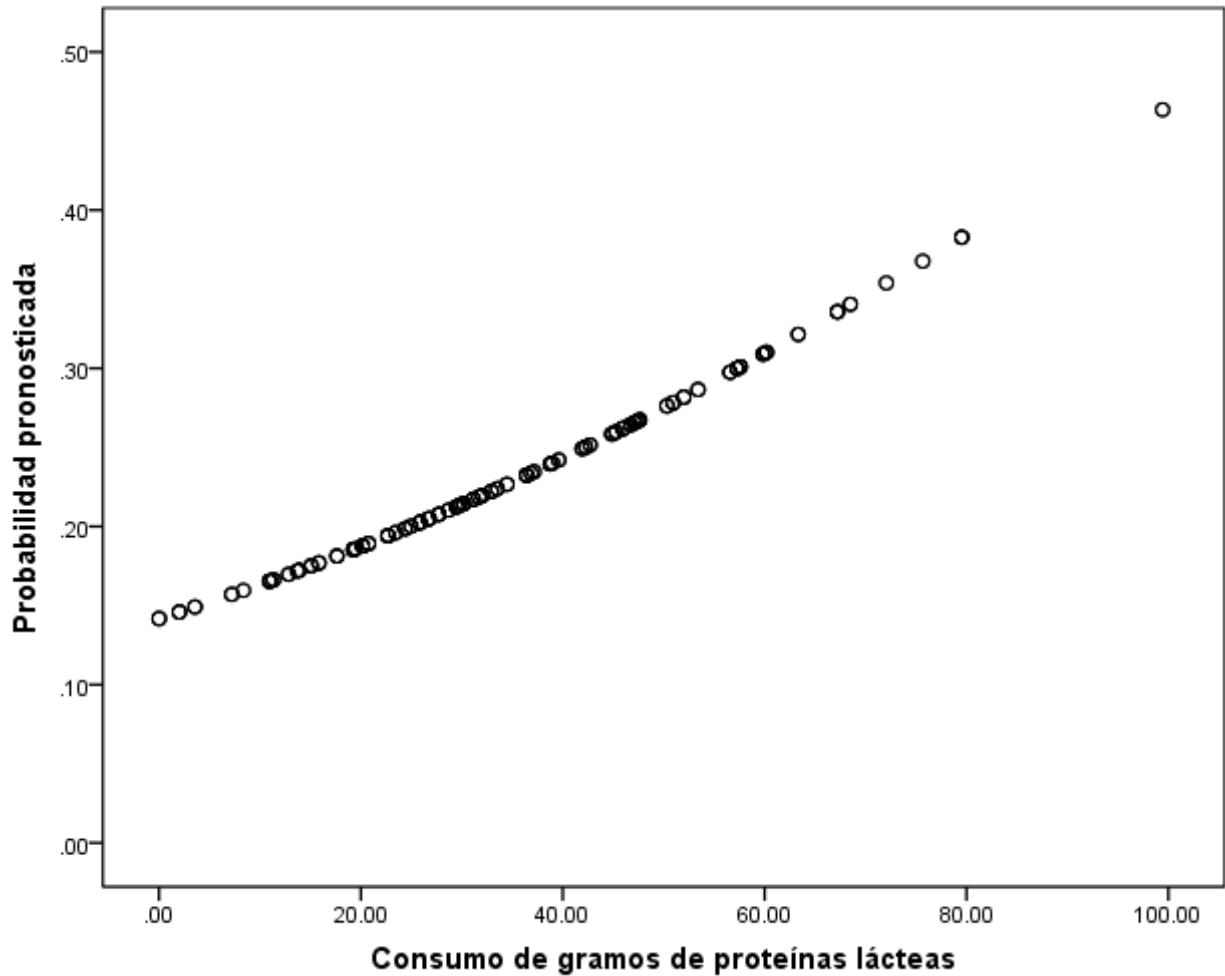


Figura 13. Probabilidad pronosticada del aumento en la concentración de BCM-7 bovina por el consumo de proteínas lácteas ($p = 0.034$)

Finalmente se realizó una regresión logística para determinar si existe probabilidad que la concentración de BCM-7 bovina aumente si se incrementa la proporción de productos lácteos (leche, queso y yogurt) de la totalidad de alimentos que integran la dieta de las mujeres en periodo de lactancia, los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 12. Probabilidad de aumentar la concentración de BCM-7 bovina de acuerdo a la proporción de productos lácteos consumidos

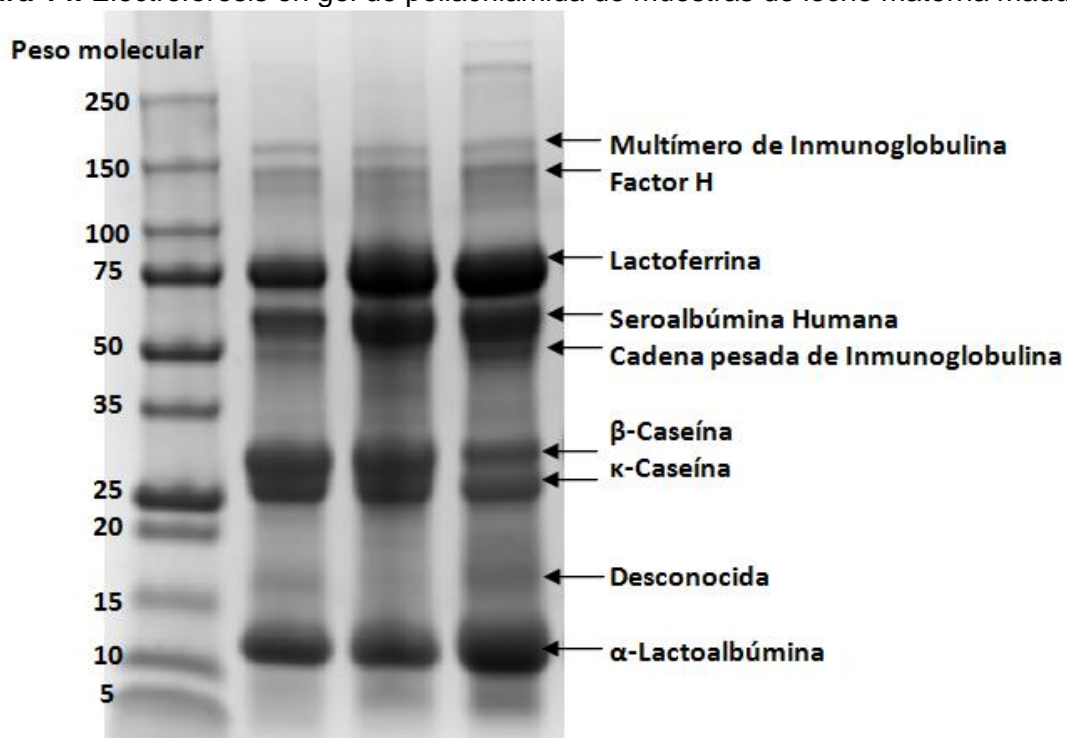
Proporción de consumo de productos lácteos	RM	Concentración de BCM-7 bovina ng/mL		
		95% IC		Sig
leche	1.79	0.23	14.15	0.58
queso	1.13	0.14	8.94	0.91
yogurt	0.95	0.78	1.17	1.91

La regresión logística no fue estadísticamente significativa, ya que los tres productos lácteos presentaron una significancia > 0.05 , por lo que la probabilidad de aumentar la concentración de BCM-7 bovina no depende del incremento en la proporción de productos lácteos consumidos.

7.4 Perfil de proteínas en la leche materna

Se realizó electroforesis para analizar el perfil de proteínas de la leche materna. En la figura 14 se presentan las principales proteínas identificadas en las muestras de leche por SDS-PAGE, con su respectivo peso molecular en kDa así como su abundancia relativa.

Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida de muestras de leche materna madura



Con los datos presentados en la tabla 12, se calculó la relación media de suero:caseína de la leche materna madura, presentando un valor de 69:31.

Tabla 12. Perfil proteico en muestras de leche materna madura

Proteína	Peso Molecular (kDa)		Abundancia Relativa	
	Media	DS	Media	DS
Multímero de Ig	173.72 ±	13.89	1.72 ±	0.64
Facto H	146.11 ±	10.73	2.98 ±	1.18
Lactoferrina	77.33 ±	4.63	19.25 ±	4.14
Seroalbúmina humana	60.21 ±	3.27	10.27 ±	2.11
Cadena pesada de Ig	50.76 ±	2.75	2.95 ±	1.44
β Caseína	27.94 ±	3.23	20.84 ±	6.13
κ Caseína	24.82 ±	3.51	9.98 ±	2.97
Desconocida	15.08 ±	2.77	1.53 ±	0.79
α-Lactoalbúmina	10.01 ±	2.45	30.46 ±	4.44

7.5 Secuenciación de BCN humana

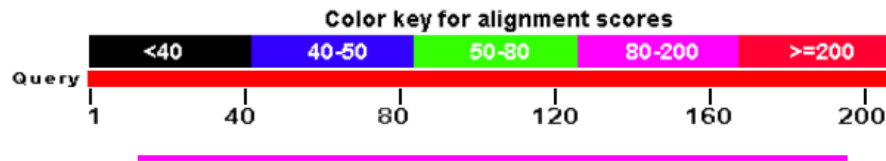
Se realizó la electroforesis de 3 pools de muestras de leche materna donde se extrajeron las bandas correspondientes al peso molecular de la bCSN mediante la técnica de HPLC acoplado a un espectrómetro de masas. Se reportó solamente una secuencia de aminoácidos, con ausencia de isoformas. La secuencia de la proteína fue la siguiente:

RETIESLSSEESITEYKQKVEKVKHEDQQQGEDEHQDKIYPSFQPQPLIYPFVEP
IPYGFLPQNILPLAQPAVVLPVPQPEIMEVPAKADTVYTKGRVMPVLKSPTIPFFDP
QIPKLTDLNLHLPLLLQPLMQQVPQPIQTLALPPQPLWSVPQPKVLPQPQVV
PYPQRAVPVQALLLNQELLLNPTHQIYPVTQPLAPVHNPISV

La proteína bCSN humana presentó una secuencia de 211 aminoácidos y un peso molecular de 25.38 kDa, que difiere del peso reportado para beta caseína bovina (23.9 kDa) así como del número de aminoácidos (209). Por esta razón, se realizó emparejamiento de las secuencias de ambas proteínas, utilizando la herramienta electrónica BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), los resultados se muestran en la figura 15. La línea en color rosa indica que al menos un rango de 80 a 200

aminoácidos fueron alineados y comparados entre ellos para determinar la similitud de las proteínas, por lo que es altamente compatible.

Figura 15. Número de aminoácidos alineados entre la bCNS humana y bovina



La figura 16, muestra las secuencias y alineación de aminoácidos de ambas proteínas. La comparación en las secuencias en la beta caseína bovina inicia en el aminoácido 14, mientras que en la beta caseína humana inicia en el aminoácido 23, en estas posiciones ambas proteínas son alineadas y es posible compararlas.

Figura 16. Alineación de la secuencia de aminoácidos de bCNS humana y bovina

		Identities 100/186 (54%)	Positives 123/186 (66%)	Diferencia 2/186 (1%)
bCSN bovina	14	ITEYKQKVEKVKHEDQQQGEDEHQDKIYPSFQPQPLIYPFVEPIPYGFLPQNILPLAQ-P	72	
Similitudes		IT +K+EK + E+QQQ EDE QDKI+P Q Q L+YPF PIP LPQNI PL Q P		
bCSN humana	23	ITRINKKIEKFQSEEQQTDELDQKIHFFAQTQSLVYPPFGPIPNPNS-LPQNIPLTQTP	81	
bCSN bovina	73	AVVLPVPQPEIMEVPAKADTVYTKGRVMPVLKSPTIPFFDQIPKLTDLNLHLPLLLQ	132	
Similitudes		VV P QPE+M V K K+ + K + MP K P PF + Q LTD+ENLHLPLLLQ		
bCSN humana	82	VVVPFLQPEVMGVSKVKEAMAPKHKEMPFKYPVEPFTESSQLTLDVNLHLPLLLQ	141	
bCSN bovina	133	PLMQQVQPQIPQTLALPPQPLWSVPQKVLPIPQQVVPYQRAVPVQALLLNQELLNPT	192	
Similitudes		M Q QP+P T+ PPQ + S+ Q KVL P+PQ+ VPYPQR +P+QA LL QE +L P		
bCSN humana	142	SWMHQPHQPLPPTVMFPQSLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPV	201	
bCSN bovina	193	HQIYPV	198	
Similitudes		+P+		
bCSN humana	202	RGPFPI	207	

El principal resultado obtenido es que sólo existe un 54% de similitud entre ambas proteínas. El 66% que corresponde al porcentaje positivo, se refiere a que algunos aminoácidos de la beta caseína bovina podrían coincidir con la humana, estos están marcados con el signo + en la banda de “similitudes”. La diferencia marcada como 2/186 indica que existen dos aminoácidos en la secuencia de la proteína bovina que no están presentes en la forma humana, estos están identificados con el signo -.

VIII. Discusión

La presente investigación analizó principalmente el consumo de lácteos aportados en la dieta de las mujeres en periodo de lactancia, como precursor de BCM-7 bovina.

Los resultados muestran que el principal producto lácteo ingerido por las mujeres es la leche entera, siendo el 84.8% de las participantes quien lo consume, este resultado es superior al reportado por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (Rivera *et al.*, 2012), donde el 45% de los adultos encuestados, reportaron el consumo de este tipo de leche. La mayoría de la población refirió consumir productos lácteos, que contribuyó a cubrir con la ingesta diaria recomendada para mujeres en periodo de lactancia en calcio y vitamina D.

El análisis del perfil proteico de la leche materna, permitió obtener información sobre la composición de este fluido. La relación suero:caseína obtenida en este trabajo, fue de 69:31, siendo similar a reportadas en investigaciones realizadas anteriormente. Kuns *et al.*, (1990), con muestras de leche materna madura de mujeres sanas residentes de California USA, determinaron una relación de suero:caseína de 65:35 en muestras de leche materna 15 días post parto, y de 60:40 en la lactancia tardía.

La abundancia relativa de las proteínas presentes en la leche materna analizada en este trabajo son similares a los reportados por Velona *et al.*, (1999), siendo bCSN la proteína con mayor contenido en la leche materna madura con una variación de 2.7 a 5 g/L. Raiha (1985) obtuvo en su trabajo realizado una abundancia relativa de la bCSN del 15% del total de proteínas contenidas en la leche humana. La bCSN es una proteína de importancia nutricional al presentar un patrón de aminoácidos equilibrados, aportando aminoácidos esenciales además de calcio y fosfato (Raiha 1985). Los resultados obtenidos, eran esperados, ya que las muestras analizadas correspondían a leche materna madura, por lo que existe una mayor producción y concentración de bCSN en la glándula mamaria, debido al incremento del volumen de leche producida.

La leche materna presentó un contenido de α LA y lactoferrina en un 30.46% y 19.25% respectivamente, lo cual contrasta con la cantidad encontrada en la leche de vaca. La leche bovina presenta una concentración de 0.6 a 1.7 g/L de α LA y trazas de lactoferrina (0.02 a 0.1 g/L) (Farrell *et al.*, 2004). En fórmulas infantiles enriquecidas, la concentración de α LA llegan a presentar 20% de las proteínas totales, sin embargo, las fórmulas generales aportan aproximadamente 10% (Lien *et al.*, 2003), mientras que las fórmulas infantiles carecen de lactoferrina, al ser una proteína que se encuentra en cantidades muy disminuidas, mientras que en la leche materna existen cantidades de 1 – 2 g/L (Ballard *et al.*, 2013).

En el gel de electroforesis se detectó la presencia de una proteína de 15 kDa de peso molecular. Se sospechaba que fuera bLG, ya que otras investigaciones han mostrado una banda similar y la han relacionado con esta proteína. Por lo que decidimos identificarla media la secuenciación de la misma por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masa, para determinar el tipo de proteína que corresponde (datos no mostrados). El reporte de la secuenciación sugería que las proteínas contenidas en la banda del gel podrían ser; α LA (16.2 kDa), proteína inductora de prolactina (16.6), peptidil-prolilcic-transisomerasa A (17.9), entre otras, sin embargo estas son las que presentaban el peso molecular similar al que correspondía la banda de 15 kDa. Estos datos no son del todo seguros, debido a que las condiciones en las que se encontraba la banda analizada, resultó ser una muestra diluida y la cantidad de proteína no fue suficiente para determinar con mayor seguridad, los tipos de proteína que estaban contenidos en ella, sin embargo, en ninguna proteína detectada en la banda analizada resultó presente bLG o péptidos derivados de esta.

Con la finalidad de identificar si la bCSN humana podría ser precursor para la formación de BCM-7 bovina ó si la secuencia de aminoácidos que conforman la BCM-7 bovina estaba presente en la bCSN humana, se decidió secuenciar a esta proteína. No se obtuvo ningún resultado positivo, por lo que no existieron

secuencias idénticas de BCM-7 bovina sobre la cadena de aminoácidos que conforman la bCSN humana. Se determinó la homología de las secuencias de bCSN humana con bCSN bovina. En términos de igualdad entre estas proteínas, sólo corresponde el 54% a la similitud entre ellas. Este valor es semejante al obtenido por Greenberg *et al.*, (1983), donde reportaron que el 47% de las secuencias eran iguales. La diferencia de los porcentajes, podría deberse a que Greenber *et al.*, inician la comparación de la bCSN humana desde el aminoácido 1 de la cadena polipeptídica y en el número 10 para la variante bovina, mientras que la alineación realizada en este experimento inicia en el aminoácido 14 para la variante bovina y 23 para la humana, excluyendo a los aminoácidos que conforman a los péptidos señal. La bCSN humana presentó una secuencia de 211 aminoácidos y un peso molecular de 25.38 kDa.

Investigaciones realizadas, han nombrado a la bCSN humana contenida en la leche materna como tipo A2. Esta variante de caseína se encuentra en la leche de oveja, cabra y en ganado bovino Guernesey y jersey. Son nombradas del tipo A2, por contener una prolina en las posiciones equivalentes de sus cadenas (Lönnnerdal *et al.*, 1990, Provot *et al.*, 1989), además de que este tipo de variante de bCSN no produce BCM-7.

Algunos investigadores han reportado la presencia de BCM-7 bovina en leche materna, atribuyendo su presencia a factores tales como: permeabilidad intestinal aumentada, deficiencia en la eficacia de la enzima DPP IV, alteraciones en la absorción de la mucosa intestinal.

Existe una gran variabilidad en las mediciones de BCM-7 reportada en los diferentes trabajos. Jarmolowska *et al.*, (2007), encontraron una concentración media de 0.39 ± 0.07 $\mu\text{g/mL}$ en muestras de leche materna obtenidas un mes post parto, de mujeres sanas, mientras que Sidor *et al.* (2008) determinaron una concentración media de BCM-7 de 1.26 ± 0.64 $\mu\text{g/ml}$ en muestras de leche humana de mujeres con historial de alergia (asma y alergia a las proteínas bovinas), por otro lado, Kost *et al.*, (2009) analizaron la presencia de BCM-7 en suero de lactantes alimentados al seno materno con una media de 67 fmol/mL, que

son concentraciones más bajas a las reportadas en este estudio. Cabe mencionar que estos autores mencionan únicamente el término BCM-7 donde no se especifica que únicamente cuantificaron a los péptidos de origen bovino. Nuestra metodología permitió identificar concretamente a la BCM-7 bovina, ya que se utilizaron estándares específicos para este péptido, con un tiempo de retención de 2.81 ± 0.03 minutos.

El método utilizado en esta presentación, permitió cuantificar los péptidos que presentaran únicamente el peso molecular similar al del estándar y no sólo los que tuvieran el mismo tiempo de retención, que es la metodología que se utilizó en otras investigaciones publicadas donde cuantificaron una mayor cantidad de BCM-7 en muestras de leche materna, pudiendo sobreestimar el resultado, además de no especificar el origen del péptido, humano o bovino.

Algunos grupos de investigación han cuestionado la veracidad de los efectos negativos atribuidos a la BCM-7. Uno de los argumentos que utilizan es que la BCM-7 no puede atravesar la pared intestinal. Existen pocas investigaciones relacionadas con el transporte celular de oligopéptidos de bCSN. Shimidzu *et al.*, (1997) en un estudio *in vitro* realizado utilizando células CaCo2, demostraron que BCM-5 bovina (Tyr-Pro-Phe-Pro-Glu) puede pasar de la región apical a basal, lo que sugiere que BCM-5 ingresa a la circulación general. Iwan *et al.*, (2008), utilizando BCM-7 humana (Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile) demostró un transporte eficaz de BCM-7 humana a través de la monocapa de células Caco-2 en presencia de la DPP IV.

Otros autores que han estudiado péptidos bioactivos derivados de la bCSN como Koch *et al.*, (1988) sugieren que BCM-8 puede ser producida a partir de bCSN en la glándula mamaria a partir de la bCSN humana. Un mecanismo propuesto es que algunos componentes de la leche materna son liberados de la glándula mamaria, y están ligados a mecanismos regulatorios, que controlan las funciones secretorias o proliferativas de la glándula mamaria. Se sugiere que la BCM-7 puede participar en la modulación de funciones opioides.

En esta investigación se demostró la presencia de BCM-7 bovina en leche humana, con una técnica específica que permitió detectar y cuantificar el péptido mediante UPLC acoplado a espectrómetro de masas, que no se había utilizado en alguna otra investigación ya publicada. La concentración del péptido encontrada en las muestras analizadas en esta investigación está reportada en ng/mL que es 1000 veces menor a las registradas por Jarmoloska *et al.*, (2007).

De acuerdo con nuestro estudio no existe diferencia significativa entre la concentración media de BCM-7 bovina en las muestras de leche materna madura y los días post parto en las que fueron obtenidas. Este resultado es similar al reportado por Jarmoloska *et al.*, (2007) y Sidor *et al.*, (2008), quienes no encontraron diferencia significativa entre las concentraciones de BCM-7 en muestras obtenidas en el primer y cuarto mes post parto, por lo que la concentración del péptido se mantuvo constante, sin embargo ambos autores encontraron un mayor contenido de BCM-7 en muestras de calostro en comparación con la leche materna madura, cabe mencionar que ambas investigaciones no especifican si el péptido cuantificado en las muestras de leche materna es de origen humano o bovino. Por otro lado tampoco se encontró diferencia significativamente estadística con respecto a la concentración de BCM-7 bovina y el horario en el que las muestras fueron extraídas, sin embargo, existió una tendencia a presentar mayor concentración del péptido en las muestras de leche que fueron obtenidas en el horario matutino. No existe evidencia científica publicada si la concentración de BCM-7 bovina en leche materna depende de hora del día en la que es extraída la leche, sin embargo un estudio realizado por Khan *et al.*, (2013), encontraron que la concentración media de caseínas totales en la leche materna fue de 3.4 g/L \pm 1.0, y que esta concentración no fue afectada por la frecuencia y duración de la succión durante la alimentación, cantidad de leche, número de tomas, así como por la hora del día (mañana, tarde ó noche).

El hallazgo más importante de la investigación, fue que la concentración de BCM-7 bovina en leche materna, se ve afectada por la ingestión total de proteínas provenientes de productos lácteos. Las muestras de leche materna que

presentaron mayor concentración del péptido, corresponden a aquellas participantes donde hubo un mayor consumo de proteínas lácteas. No existen reportes científicos publicados que asocien el consumo de proteínas lácteas con la concentración de BCM-7 bovina, sin embargo, la presente investigación permitió estimar la probabilidad de aumentar la concentración de BCM-7 bovina si se incrementa el consumo de proteínas lácteas. Por lo que su presencia en leche materna puede deberse al consumo de lácteos durante la lactancia, aunado a una posible permeabilidad intestinal aumentada en las mujeres, aumentando el riesgo del desarrollo de pseudo alergias en el lactante alimentado al seno materno, así como las patologías a las que BCM-7 bovina se les ha relacionado. Se necesita mayor investigación y conocimiento del tema, para determinar cuanta es la cantidad necesaria de BCM-7 bovina para ejercer efectos fisiológicos negativos en los lactantes, siendo esta investigación el primer paso para modificar las guías de alimentación, donde se recomiende el consumo de productos lácteos que contengan únicamente bCSN A2, como una medida preventiva en aquellos casos donde el infante presente pseudoalergia a la leche cuando es alimentado al seno materno.

IX. Conclusión

El trabajo realizado permitió el desarrollo de un método para la cuantificación específica de BCM-7 bovina, lo que permitió confirmar la presencia del péptido en muestras de leche materna madura.

Hubo una asociación entre el consumo de productos lácteos y la concentración de BCM-7 bovina en leche materna madura.

En este trabajo existió 1.18 veces de probabilidad de aumentar la concentración de BCM-7 bovina, por cada 10 gramos de proteínas lácteas ingeridas, por lo que es necesario continuar investigando para poder afirmar esta información.

Obtuvimos la secuencia de la bCSN humana la cual conserva únicamente el 54% de homología con respecto a la variante de bCSN bovina del tipo A2. Algunos autores nombran a la bCSN humana como tipo A2, aún cuando la semejanza entre ellas es baja. No obstante, al igual que la bCSN bovina A2, a partir de la variante humana no es posible producir BCM-7 bovina, ya que no existe una secuencia idéntica de este péptido en la cadena de aminoácidos que la conforman, que potencialmente pudiera ser liberada durante su digestión.

Se identificó una banda de proteína que otros autores han mencionado pudiera ser bLG, sin embargo, mediante una secuenciación de dicha proteína se pudo descartar que esta fuera bLG.

X. Limitaciones del estudio

En este estudio no fue posible obtener muestras de leche materna, de mujeres que no consumieran lácteos y derivados durante el periodo de lactancia. Estas muestras podrían haber funcionado como muestras control, donde se esperaría no detectar o cuantificar BCM-7 bovina. De haber contado con este tipo de muestras en el estudio, se pudiera haber esperado encontrar una diferencia significativa en la concentración del péptido y entre el grupo que consume lácteos del que no lo hace. La concentración de BCM-7 bovina, también podría haber estado influenciada por el tipo de bCSN contenida en los productos lácteos, ya que se desconoció si estos contenían del tipo A1, A2 o ambos. Algunos productos pudiesen haber contenido una mayor proporción de bCSN A2 y por lo tanto no liberaron BCM-7 bovina. Otra característica fisiológica que puede alterar la concentración del péptido estudiado, es la permeabilidad intestinal, no se realizaron pruebas para conocer como se encontraba la permeabilidad de las participantes, ya que ellas se encontraban clínicamente sanas aparentemente.

Se sabe que la composición de la leche materna es altamente variable, por lo que la concentración del péptido pudo haber sido afectada dependiendo del momento en que la muestra fue obtenida, es decir, si la leche materna correspondía a los primeros mililitros obtenidos de la extracción, la cual se caracteriza por mayor contenido en agua y proteínas o si la muestra se obtuvo al final de la tetada, mayor concentración de grasas. Las condiciones en que se recolectaron las muestras no fueron las mismas para todas las participantes, por lo que esto pudo haber tenido influencia en la cantidad del péptido determinado.

XI. Literatura Citada

- Álvarez B., Duarte M., Rosado M., 2014. Estudio de perfil proteínico de las fórmulas infantiles de inicio comercializadas en México. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Augustyns K., Bal G., Thonus G., Belyaev A., Zhang XM., Bollaert W., Lambeir AM., Durinx C., Goossens F., Haemers A. 1999. The unique properties of dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV / CD26) and the therapeutic potential of DPP IV inhibitors. *Curr Med Chem.* 6 (4): 311-27.
- Bagnicka E., Strzałkowska N., Józwick A., Krzyżewski J., Horbańczuk J., Zwierzchowski L., 2010. Expression and polymorphism of defensins in farm animals. *Acta Biochimica Polonia.* 57 (4): 487–497
- Bourges H., Casanueva E., Rosado J. 2008. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana bases fisiológicas. Tomo 2. Editorial Médica Panamericana. México, D.F.
- Brantl V., Teschemacher H., Henschen A., Lottspeich F. 1979. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 360 (9): 1211–1216.
- Caroli A., Chessa S., Erhardt G. 2009. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *J Dairy Sci.* 92 (11): 5335-52.
- Cieślińska A., Kostyra E., Kostyra H., Oleński K., Fiedorowicz E., Kamiński S. 2012. Milk from cows of different β -casein genotypes as a source of β -casomorphin-7. *Int J Food Sci Nutr.* 63 (4): 426-30
- Cieslinska A., Kostyra E., Sienkiewicz-Szlapka E. 2007. Beta-casomorphin 7 in raw and hydrolyzed milk derived from cows of alternative beta-casein genotypes. *Milch Wissens Schaft-Milk Science International* 62(2):125-127
- CONARGEN Consejo Nacional de los Recursos Genéticos Pecuarios, 2013 Revisado de <http://www.conargen.mx/index.php/asociaciones/bovinos-leche>. Fecha de acceso 17 Septiembre 2014

- Conrad B., Weissmahr R., Böni J., Arcari R., Schüpbach J., Mach B. 1997. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell*. 90(2): 303-13.
- De Greef E., Hauser B., Devreker T., Veereman-Wauters G., Vandenplas Y. 2012. Diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *World J Pediatr*, 8 (1): 19-24
- De Noni, I., 2008. Release of b-casomorphins 5 and 7 during simulated gastrointestinal digestion of bovine b-casein variants and milk-based infant formulas. *Food Chem*. 110(4): 897-903
- De Noni I., Cattaneo S., 2010. Occurrence of b-casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following in vitro simulated gastro-intestinal digestion *Food Chem*. 119 (2): 560–566
- Elitsur Y., Luk G. 1991. Beta-casomorphin (BCM) and human colonic lamina propria lymphocyte proliferation. *ClinExpImmunol*. 85 (3): 493–497.
- Elliott R., Harris D., Hill J., Bibby N., Wasmuth H., 1999. Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia* 42 (3): 292-296
- Elliott R., Wasmuth H., Bibby N., Hill J., 1997. The role of beta-casein in the induction of insulin-dependent diabetes in the non-obese diabetic mouse and humans. Brussels: International Dairy Federation, Seminar on Milk Protein Polymorphism. 9702 (1): 445-453.
- Farrell H., Jimenez-Flores R., Bleck T., Brown E., Butler J., Creamer L., Hicks C., Hollar C., Ng-Kwai-Hang K., Swaisgood H. 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. American Dairy Science Association. *J. DairySci*. 87 (6): 1641–1674
- Fiedorowicz E., Kaczmarek M., Cieslinska A., Sienkiewicz E., Jarmolowska B., Chwałac B., Kostyraa E., 2014. β -casomorphin-7 alters μ -opioid receptor and dipeptidyl peptidase IV genes expression in children with atopic dermatitis. *Peptides* 62: 144-149.
- Ganapathy V., Miyauchi S. 2005. Transport systems for opioid peptides in mammalian tissues. *The AAPS* 29 7(4): E852-6.

- Greenberg R., Groves M., Dower H. 1984. Human beta-casein. Amino acid sequence and identification of phosphorylation sites. *J Biol Chem.* 25; 259 (8): 5132-8.
- Islam M., Alam M., Islam M., Khan M., Ekeberg D., Rukke E., Vegarud G., 2014. Principal Milk Components in Buffalo, Holstein Cross, Indigenous Cattle and Red Chittagong Cattle from Bangladesh. *Asian-Australas J Anim Sci.* 27 (6): 886–897.
- Iwan M., Jarmolowska B., Bielikowicz K. 2008. Transport of μ -opioid receptor agonists and antagonist peptides across Caco-2 monolayer. *Peptides* 29 1042 – 1047
- Jarmolowska B., Bielikowicz K., Iwan M., Sidor K., Kostyra E., Kaczmarek M. 2007. Serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV; EC 3.4.14.5) in breast-fed infants with symptoms of allergy. *Peptides.* 28(3):678-82.
- Jarmolowska B., Kostyra E., Krawczuk S., Kostyra H., 1999. β -Casomorphin-7 isolated from Brie cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (13): 1788–1792
- Jarmolowska B., Sidor K., Iwan M., Bielikowicz K., Kaczmarek M., Kostyra E., Kostyra H., 2007. Changes of b-casomorphin content in human milk during lactation. *Peptides* 28 (10): 1982-1986
- Jinsmaa Y., Yoshikawa M., 1997. Enzymatic release of neocasomorphin and beta casomorphin from bovine beta casein. *Peptides* 20 (8): 957–962
- Khan S, Hepworth A, Ed D, Prime D, Lai C, Trengove N, Hartmann P. 2013. Variation in fat, lactose and protein composition in breast milk over 24 hours: Associations with infant feeding patterns. *J Hum Lact.* 29 (1): 81-89.
- Kamiński S., Ciecelińska A., Kostyra E., 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J Appl Genet* 48 (3): 189–198
- Koch G., Wiedemann K., Drebes E., Zimmermann W., Link G., Teschemacher H. 1988. Human β -casomorphin-8 immunoreactive material in the plasma of women during pregnancy and after delivery. *Regulat. Peptides.* (2): 107–117.
- Kost N., Sokolov Y., Kurasova O., Dmitriev A., Tarakanova J., Gabaeva M., Zolotarev Y., et al., 2009. B-Casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides.* 30 (10): 1854-60.

- Lönnerdal B., 1990. Biochemistry and physiological function of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 42 (6): 1299 -1317
- Lönnerdal, B., Forsum, E., Hambraeus, L. 1976. A longitudinal study of the protein, nitrogen, and lactose contents of human milk from Swedish well-nourished mothers. *Am. J. Clin. Nutr.* 29: 1127-1133.
- Lönnerdal, B. 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 77(suppl): 1537-1543S.
- Lönnerdal, B., Lien, E.L. 2003. Nutritional and Physiologic Significance of α -Lactalbumin in Infants. *Nutr. Rev.* (61) 9: 295-305.
- Lönnerdal, B. 2013. Bioactive proteins in breast milk. *J. Paediatr. Child H. (Suppl:1)*: 1-7.
- Martin P., Bianchi L., Cebo C., Miranda G., 2013. Genetic Polymorphism of Milk Proteins. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 463 4th Edition. Springer Science Business Media New York.
- McLachlan C., 2001. Beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Med Hypotheses.* 56 (2): 262-72.
- McLean D., Graham E., Ponzoni R., McKenzie H., 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J Dairy Res.* 51 (4): 531-46.
- Mishra B., Mukesh M., Prakash B., Sodhi M., Kapila R., Kishore A., 2009. Status of milk protein, β -casein variants among Indian milch animals. *Indian Journal of Animal Sciences* 79 (7): 722-725.
- Nissen A., Bendixen E., Ingvarsen K., Røntved C., 2013. Expanding the bovine milk proteome through extensive fractionation. *J Dairy Sci.* 96 (12): 7854-66
- Raiha N. 1985. Nutritional proteins in milk and the protein requirements of normal infants. *Pediatrics* 75 (1 Pt 2):136-41.
- Ramiro-Puig E., Pérez-Cano J., Castellote C., Franch A., Castell M. 2008. El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Rev Esp Enferm Dig.* 100 (1): 29-34.
- Reichelt K., Seim A., Reichelt W., 1996. Could schizophrenia be reasonably explained by Dohan's hypothesis on genetic interaction with a dietary peptide overload? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 20 (7): 1083-114.

- Roginski H. 2003. Encyclopedia of dairy sciences. Academic Press, London. 2739–2745
- Sai Y., Kajita M., Tamail I., Wakama J., Wakamiya T., Tsuji A., 1998. Adsorptive-mediated endocytosis of a basic peptide in enterocyte-like Caco-2 cells. *Am J Physiol.* 275 (3 Pt 1): 514-520
- Sato R, Noguchi T, Naito H. 1986. Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J NutrSciVit* 32 (1): 67-76.
- Schieber A., Brückner H., 2000. Characterization of oligo- and polypeptides isolated from yogurt. *Eur Food Res Technol.* 210 (5): 310–313
- Shimizu M., Tsunogai M., Arai S., 1997. Transepithelial Transport of Oligopeptides in the Human Intestinal Cell, Caco-2. *Peptides.* 18 (5): 681–687
- Sidor K., Jarmołowska B, Kaczmarek M, Kostyra E, Iwan M, Kostyra H. 2008. Content of β -casomorphins in milk of women with a history of allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 19 (7): 587–591.
- Singh T., Fox P., Healy A. 1997. Isolation and identification of further peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction of Cheddar cheese. *J Dairy Res.* 64 (3), 433-43.
- Sokolov O., Kost N., Andreeva O., Korneeva E., Meshavkin V., Tarakanova Y., Zozulya A. 2014. Austitic children display elevated urine levels of bovine casomorphin-7 immunoreactivity. *Peptides*, 56: 68-71.
- Stewart A., Bonsing J., Beattie C., Shah F., Willis I., Mackinlay A. 1987. Complete Nucleotide Sequences of Bovine α_{s2} - and β -casein cDNAs: Comparisons with Related Sequences in Other Species. *Mol. Biol. Evol.* 4 (3): 231-241
- Sun Z., Zhang Z., Wang X., Cade R., Elmir Z., Fregly M., 2003. Relation of β -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides* 24: 937–943.
- Svedberg J., Haas J., Leimenstoll G., Paul F., Teschemacher H., 1985. Demonstration of β -casomorphin immunoreactive materials in In Vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine. *Peptides* 6: 825-830.
- Tailford K., Berry C., Thomas A., Campbell J., 2003. A casein variant in cow's milk is atherogenic. *Atherosclerosis* 170 (1): 13-19.

- Teschemacher H., Umbach M., Hamel U., Praetorius K., Ahnert G., Brantl V., 1986. No evidence for the presence of β -casomorphins in human plasma after ingestion of cow's milk or milk products. *J Dairy Res.* 53 (1): 135-8.
- Toelstede S., Hofmann T., 2008. Sensomics Mapping and Identification of the Key Bitter Metabolites in Gouda Cheese. *J. Agric. FoodChem.* 56 (8): 2795–2804.
- Torreilles J., Guérin M. 1995. Casein-derived peptides can promote human LDL oxidation by a peroxidase-dependent and metal-independent process. *C R SeancesSocBiol Fil.* 189 (5): 933-942.
- UNICEF, 2014. Extracción de leche materna cuando la madre trabaja separada de su niño. Revisado de ww.unicef.cl/lactancia/docs/mod05/Mod%205%20extraccion%20leche.pdf Fecha de acceso 20 Junio 2015
- Velonà T., Abbiati L., Beretta B., Gaiaschi A., Flauto U., Tagliabue P., Galli C., Restani P. 1999. Protein profiles in breast milk from mothers delivering term and preterm babies. *Pediatr Res.* 45 (5): 658-663.
- Wada Y., Lönnerdal B., 2014. Bioactive peptides derived from human milk proteins – mechanisms of action. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (5): 503-514.
- Wasilewska J., Sienkiewicz E., Kuzbida E., Jarmołowska B., Kaczmarek M., Kostyra E., 2011. The exogenous opioid peptides and DPPIV serum activity in infants with apnoea expressed as apparent life threatening events (ALTE). *Neuropeptides.* 45 (3): 189-95.
- Whiteley P., Haracopos D., Knivsberg A. M., Reichelt K. L., Parlar S., Jacobsen J. 2010. The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. *Nutr. Neurosci.* 13 (10), 87–100
- Whiteley P., Shattock P., Knivsberg A., Seim A., Reichelt K., Todd L., Carr K., Hooper M., 2013. Gluten and casein free dietary intervention for autism spectrum conditions. *Front Hum Neurosci.* 2013 4 (6): 344