



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”
Multidisciplinario
21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Título del trabajo:

Presencia de β - Casomorfina 7 (BCM-7) en orina de lactantes sanos alimentados con fórmulas infantiles comerciales

Autor: Lorena Guadalupe Oropeza Ceja,
Estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas
loreniza15@gmail.com
Universidad Autónoma de Querétaro

Co-Autores:

MC. Beatriz Salcedo
bsalcedo@cindetec.org
CINDETEC A.C.

QFB. Rubí A. Paredes Ramírez
rparedes@cindetec.org
CINDETEC A.C.

MHN. Dolores Ronquillo González
lolitaron@hotmail.com
Universidad Autónoma de Querétaro

MHN. Ma. Guadalupe Martínez Peña
nutgua@hotmail.com
Universidad Autónoma de Querétaro

Dra. Olga Patricia García Obregón
opgarciao@yahoo.com.mx
Universidad Autónoma de Querétaro

Dr. Jorge Luis Rosado Loria
jlorosado@prodigy.net.mx
Universidad Autónoma de Querétaro, CINDETEC A.C.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Presencia de β - Casomorfina 7 (BCM-7) en orina de lactantes sanos alimentados con fórmulas infantiles comerciales

Resumen

β -casomorfina-7 (BCM-7) se produce tras la digestión gastrointestinal de β -caseína bovina de tipo A1 proveniente de fórmulas infantiles comerciales. Se han encontrado niveles plasmáticos de BCM-7 por un método de radioinmunoensayo y en orina de niños con trastorno autista por ELISA. Se montó un método para la cuantificación de BCM-7 en orina de bebés. La metodología analítica involucró inicialmente un proceso de extracción por fase sólida de los analitos y posteriormente se utilizó el sistema UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) acoplado a masas (MS). El método propuesto en este trabajo detectó concentraciones de BCM-7 en un rango de 0.301 a 1.189 ng/mL en lactantes sanos menores de 5 meses alimentados con fórmulas infantiles comerciales.

Palabras claves BCM-7, UPLC – MS/MS, orina.

Abstract

β -casomorphin-7 (BCM-7) is released during gastrointestinal digestion of bovine β -casein A1 variant coming from commercial infant formulas. BCM-7 plasma levels were found by radioimmunoassay method and urine autistic children by ELISA. A method for quantification of BCM-7 in infant's urine was mounted. The analytical method involved a solid phase extraction process of analytes, and subsequently UPLC system (Ultra Performance Liquid Chromatography) coupled to mass (MS) was used. The proposed method detected BCM-7 concentrations ranging from 0301 to 1189 ng/mL in healthy infants aged 5 months fed commercial infant formulas.

Key words: BCM-7, UPLC – MS/MS, urine.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

I. Introducción

Las fórmulas infantiles comerciales contienen β -caseínas de tipo A1. Durante la digestión gastrointestinal de la β -caseína A1 se libera un péptido opioide hidrofílico llamado β -casomorfina-7 (BCM-7) en el organismo (Álvarez et al 2014). Este péptido se ha asociado con el desarrollo de esquizofrenia y autismo (Stark et al.1992; Pasi et al. 1993; Ermisch et al. 1983). Se ha propuesto la hipótesis de que participa en la etiología de enfermedades como el síndrome de muerte súbita del lactante, autismo (Cade et al, 2000; Sokolov et al., 2014), diabetes mellitus tipo 1 (McLachlan en 2001; Elliott et al, 1997; Hartwig et al, 1997; Elliott et al, 1999) y enfermedades cardiovasculares (Maslennikova et al, 2008; Allison y Clarke, 2006; Torreilles y Guerin 1995). Se han detectado concentraciones de BCM-7 en orina de niños con trastornos del espectro autista por un método de inmunoensayo ELISA (Sokolov et al, 2014). Se desconocen las concentraciones de BCM-7 en orina de lactantes sanos alimentados con fórmulas infantiles. El sistema UPLC-MS/MS se basa en el uso de columnas con partículas de menos de 2,5 μm en conjunto con sistemas que pueden operar a altas presiones, ofreciendo mejoras en velocidad, resolución y sensibilidad (Srivastava et al 2010). El objetivo fue desarrollar una metodología para detección de BCM-7 en orina de lactantes sanos alimentados con fórmulas infantiles de inicio.

II. Metodología

Se recolectaron muestras de orina de lactantes menores de 5 meses de edad alimentados con fórmulas infantiles en el Centro de Salud en Amazcala, El Marques Querétaro. Las madres de los lactantes firmaron un consentimiento informado y se procedió a la recolección de las muestras de orina. Se llevaron inmediatamente a refrigeración y se dividieron en alícuotas de 2 mL y se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Para desarrollar el método, se siguió una metodología similar a lo reportado por De Noni y colaboradores en 2008 con algunas modificaciones. Se utilizaron las



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

siguientes sustancias: Estándar de beta casomorfina 7 bovina de pureza: 98.70 %, metanol grado HPLC, acetonitrilo grado HPLC, Agua grado LCMS/MS, acetato de amonio grado reactivo, ácido fórmico grado reactivo LC/MS/MS y muestras de orina. Se utilizaron placas Strata XA/Strata XLA de 96 pozos para la extracción en fase sólida de las muestras. Se utilizó un Equipo UPLC de Waters, Milford, MA, EE.UU. Este sistema estuvo acoplado a un espectrómetro de masa/masa.

III. Resultados

Se prepararon las soluciones de rutina y soluciones patrón para montar el método.

- Solución patrón de BCM-7 400.0 $\mu\text{g/mL}$. Se pesó el equivalente a 2.00 mg del estándar de BCM-7, se transfirió a un matraz volumétrico de 5 mL. Se disolvió y se aforó con agua grado LC/MSMS. Esta solución contiene 400.0 $\mu\text{g/mL}$ de BCM-7.
- Solución patrón de BCM-7 100.0 $\mu\text{g/mL}$. Se tomó 1.25 mL de la solución de BCM-7 de 400.0 $\mu\text{g/mL}$ a un matraz volumétrico de 5 mL, se aforó con agua grado LC-MS/MS, mezclar. Esta solución contiene 100.0 $\mu\text{g/mL}$ de BCM-7.
- Solución patrón de BCM-7 10.0 $\mu\text{g/mL}$. Se tomó 1000 μL de la solución de BCM-7 de 100.0 $\mu\text{g/mL}$ a un matraz volumétrico de 10 mL, se aforó con agua grado LC-MS/MS. Esta solución contiene 10.0 $\mu\text{g/mL}$ de BCM-7.
- Solución patrón de BCM-7 1.0 $\mu\text{g/mL}$. Se tomó 1000 μL de la solución de BCM-7 de 10.0 $\mu\text{g/mL}$ a un matraz volumétrico de 10 mL, se aforó con agua grado LC-MS/MS, mezclar. Esta solución contiene 1.0 $\mu\text{g/mL}$ de BCM-7.

A partir de las soluciones patrón de 1.0, 10.0 y 100.0 $\mu\text{g/mL}$ de BCM-7, se preparó la curva de calibración (Tabla 1) y muestras control en solución (Tabla 2).

Tabla 1. Soluciones de concentración conocida para curva de calibración.

A partir de la solución patrón de 1.0 $\mu\text{g/mL}$ de BCM-7



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

No. de dilución	Punto	Alícuota de la solución patrón BCM-7 (μL)	Volúmen agua (μL)	Volúmen final (μL)	Concentración final de BCM-7 (ng/mL)
1	C1	150	2850	3000	50
2	C2	600	2400	3000	200

A partir de la solución patrón de 10.0 $\mu\text{g/mL}$ de BCM-7

3	C3	150	2850	3000	500
4	C4	300	2700	3000	1000
5	C5	450	2550	3000	1500
6	C6	600	2400	3000	2000

A partir de la solución patrón de 100.0 $\mu\text{g/mL}$ de BCM-7

7	C7	75	2925	3000	2500
---	----	----	------	------	------

Se prepararon las muestras control en solución de alta, media y baja concentración de BCM-7. A partir de las soluciones patrón de 1.0 y 10.0 $\mu\text{g/mL}$ de BCM-7, se prepararon las siguientes concentraciones mostradas en la tabla 2.

Tabla 2. Muestras control en solución.

No. de dilución	Muestra	Concentración de la solución patrón BCM-7 (μL)	Alícuota de la solución patrón BCM-7 (μL)	Volúmen de agua (70:30) (μL)	Volúmen final (μL)	Concentración final de BCM-7 (ng/mL)
8	BCM-7 baja	1	450	2550	3000	150
9	BCM-7 media	10	240	2760	3000	800
10	BCM-7 alta	10	540	2460	3000	1800

Se realizó la preparación de la curva de calibración y muestras control en orina de la siguiente manera. A partir de las diluciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 (Tabla 3 y Tabla 4).

Tabla 3. Curva de calibración en muestras de orina.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

No. de dilución	Punto	Concentración inicial de BCM-7 (ng/mL)	Alícuota de la solución patrón BCM-7 (µL)	Volúmen de orina (µL)	Volúmen final (µL)	Concentración teórica de BCM-7 (ng/mL)	Concentración real de BCM-7 (ng/mL)
11	C1	50	50	950	1000	2.5	2.505
12	C2	200	50	950	1000	10	10.018
13	C3	500	50	950	1000	25	25.045
14	C4	1000	50	950	1000	50	50.09
15	C5	1500	50	950	1000	75	75.135
16	C6	2000	50	950	1000	100	100.181
17	C7	2500	50	950	1000	125	125.226

Se prepararon las muestras control en orina, a partir de las diluciones resultantes en solución diluyente números 8, 9 y 10 (tabla 4).

Tabla 4. Muestras control en orina

No. de dilución	Muestra	Concentración de la solución patrón BCM-7 inicial (µL)	Alícuota de la solución patrón BCM-7 (µL)	Volúmen de orina (µL)	Volúmen final (µL)	Concentración teórica de BCM-7 (ng/mL)	Concentración real de BCM-7 (ng/mL)
18	BCM-7 baja	150	50	950	1000	30	7.514
19	BCM-7 media	800	50	950	1000	800	40.072
20	BCM-7 alta	1800	50	950	1000	1200	90.162

La curva de calibración y muestras control en orina se sometieron al proceso de extracción en fase sólida utilizando placas Strata XA/Strata XLA

Proceso de extracción:

1. Se adicionó a cada pozo de la placa 1 mL de Metanol (acondicionamiento) y 1.0 ml de agua (equilibrado)
2. Se adicionó, una alícuota de 500 µl de (muestra o estándar en orina), 50 µl de la solución patrón de BCM-7 (cada una de las diluciones de BCM-7)
3. Se adicionó 1.0 mL de acetato de amonio 25 mM pH 6.5 (lavado)



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

4. Se adicionó 1.0 mL de metanol (lavado)
5. Se adicionó 0.5 mL de ácido fórmico al 5% en metanol y se eluyó lentamente en un manifold a una presión de 4 a 5 psi.
6. Posteriormente se adicionó 0.5 ml de ácido fórmico al 5% en metanol y se eluyó nuevamente con las mismas condiciones del paso 5.
7. Se mezclaron ambas eluciones y se transfirieron a una alícuota de 900 µl, se depositaron en un tubo liso, para evaporarlas a sequedad en baño maría a una temperatura de aproximadamente 45 °C bajo una corriente de nitrógeno.
8. Se reconstituyó con 100 µl de solución de reconstitución y se agitó en vortex multitubo durante 1 minuto a 2000 rpm
9. Se transfirió a una placa de polipropileno y se inyectó en el UPLC-MS/MS a las condiciones cromatográficas correspondientes.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Fase móvil: solución de ácido fórmico 0.1 % en agua: (50), (A1): acetonitrilo (50), (B1)
- Velocidad de flujo: 0.3 mL/min
- Volumen de inyección: 3.0 µL (Partial Loop with Needle Overfill)
- Proporción de lavado inyector: 1500 µL lavado débil: 500 µL lavado fuerte
- Tiempo de corrida: 1.5 minutos.
- Temperatura del horno de columna: 35°C + 1.0°C
- Temperatura del automuestreador: 8.0°C + 1.0°C
- Columna cromatográfica: AERIS PEPTID 2.1 x 100 mm.

Los puntos de la curva de calibración se muestran en el cuadro 1. El rango de cuantificación fue de 2.5ng/mL a 125 ng/mL.

7 “Congreso Internacional de Investigación e Innovación 2016” Multidisciplinario, 21 y 22 de abril de 2016. México

Correlation coefficient: $r = 0.993692$, $r^2 = 0.987425$
Calibration curve: $0.0822713 * x + -0.0523235$
Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)



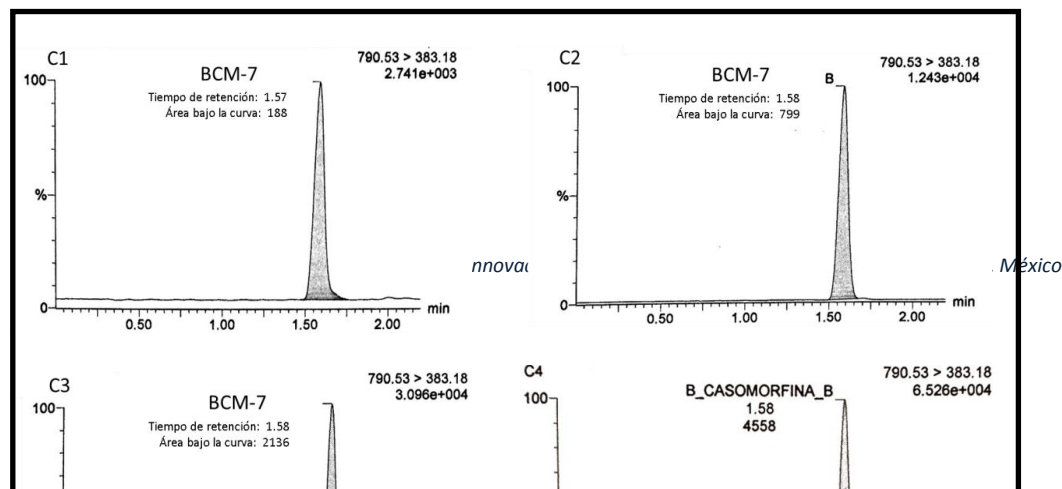


“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”
Multidisciplinario
21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Cuadro 1. Curva de calibración en muestras de Orina.

Los cromatogramas resultantes de cada punto de la curva de calibración se muestran en el siguiente cuadro 2. C1, C2, C3, representan un punto de la curva de calibración.

Cuando se analizaron las muestras de orina de lactantes alimentados exclusivamente con fórmulas el sistema UPLC detectó concentraciones de BCM-7 en un rango de 0.301 a 1.189 ng/mL. En una segunda etapa de este trabajo se realizarán optimizaciones para validar un el método con un rango de cuantificación de acuerdo con lo antes detectado.





“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”
Multidisciplinario
21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Cuadro 2. Cromatogramas de los puntos de la curva de calibración

IV. Conclusiones

Con este trabajo se comprobó que existe la presencia de BCM-7 en lactantes menores de 6 meses alimentados con fórmula infantil. BCM-7 parece ser resistente a



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

la hidrolisis acida y enzimática. Se encontraron concentraciones de BCM-7 en un rango de 0.301 a 1.189 ng/mL.

V. Bibliografía.

- Allison A. y Clarke A, (2006). Further research for consideration in “the A2 milk case”. *Eur. J. Clin. Nutr.* 60(7): 921-924.
- Álvarez B., Duarte M., Rosado JL., 2014. Estudio de perfil proteínico de las fórmulas infantiles de inicio comercializadas en México. Tesis para obtener el grado de maestro; Universidad Autónoma de Querétaro, facultad de Ciencias Naturales (Datos no publicados).
- Cade R, Privette M, Fregly M, Rowland N, Sun Z, Zele V. (2000). Autism and schizo- phrenia: intestinal disorders. *Nutr Neurosci* 3:57–72.
- De Noni, I., 2008. Release of b-casomorphins 5 and 7 during simulated gastro-intestinal digestion of bovine b-casein variants and milk-based infant formulas. *Food Chemistry* 110 897–903
- Elliott R, Harris D, Hill J, Bibby N, Wasmuth H, (1999). Type I (insulindependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia* 42: 292–296.
- Elliott R, Wasmuth H, Bibby N, Hill J, (1997). The role of beta-casein variants in the induction of insulin-dependent diabetes in the non-obese dia- betic mouse and humans. In: *Milk protein polymor- phism. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zealand.* *Int Dairy Fed:* 445–453.
- Ermisch A, Ruhle H.J, Neubert K, Hartrodt B, Landgraf R, (1983). On the blood-brain barrier to peptides: [3H]beta-casomorphin-5 uptake by eighteen brain regions in vivo. *J Neurochem.* 41(5), 1229-33.
- Hartwig A. Teschemacher H. Lehmann W. Gauly M and Erhardt 1997. Influence of genetic polymorphisms in bovine milk on the occurrence of bioactive peptides. Seminar on milk protein polymorphism, IDF número especial 9702: International Daily Federation Brussels: 459-460.
- Kaminski S, Cieslinska A, Kostyra E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J Appl Genet*;48(3):189–98.
- Maslennikova, N. V., Sazonova, E. N. and Timoshin, S. S. 2008. Effect of-casomorphin-7 on DNA synthesis in cell populations of newborn albino rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 145 (2): 210-212
- McLachlan C. (2001). β -Casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses, *Med Hypotheses*, 56 262-272.
- Pasi A, Mahler H, Linsel N, Bernasconi C, Messiha F.S, (1993). beta-Casomorphin-immunoreactivity in the brain stem of the human infant. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 80(3), 305-22.
- Sokolov O., Kost N., Andreeva O., Korneeva E., Meshavkin V., Tarakanova Y., Zozulya A. (2014). Autistic children display elevated urine levels of bovine casomorphin-7 immunoreactivity. *Peptides*, 56, 68–71.
- Srivastava B, Sharma BK, Baghel US, Yashwant, Sethi N. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): a chromatography technique. *IJPQA.* 2010; 2(1): 19-25.
- Stark H, Van Bree J.B, de Boer A.G, Jaehde U, Breimer D.D, (1992). In vitro penetration of des-tyrosine1-D-phenylalanine3-beta-casomorphin across the blood-brain barrier. *Peptides.* 13(1), 47-51.
- Torreilles J, Guerin M.C, (1995). Casein-derived peptides can promote human LDL oxidation by a peroxidase-dependent and metal-independent process. *C R Seances Soc Biol Fil.* 189(5), 933-42.