



**ANÁLISIS CIRCADIANO DE LOS
COMPONENTES NUTRICIONALES DE
LA LECHE MATERNA IMPLICADOS EN
EL SUEÑO / VIGILIA**

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS (Sección Biológicas)

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

2011

TESIS DOCTORAL | Cristina L. Sánchez López

- TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL:

**ANÁLISIS CIRCADIANO DE LOS COMPONENTES
NUTRICIONALES DE LA LECHE MATERNA QUE
INFLUYEN EN EL SUEÑO / VIGILIA.**

- DOCTORAL THESIS TITLED:

**CIRCADIAN ANALYSIS OF THE BREAST MILK
COMPONENTS INVOLVED IN SLEEP / AWAKE.**



Departamento de Fisiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Extremadura
06006-Badajoz, Spain

Tel.: +34 924 289 300 ext. 89388
Fax: +34 924 289 388

D^a. CARMEN BARRIGA IBARS, Catedrática de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la UEX y D. JAVIER CUBERO JUÁNEZ, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Didáctica de Ciencias Experimentales de la Facultad de Educación de la UEX

CERTIFICAN:

Que la siguiente Tesis Doctoral, presentada por Dña. Cristina Lucía Sánchez López, con el título: “ANÁLISIS CIRCADIANO DE LOS COMPONENTES NUTRICIONALES DE LA LECHE MATERNA IMPLICADOS EN EL SUEÑO/VIGILIA”, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología de la UEX, entendiendo que se halla finalizada y que reúne los requisitos de originalidad, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste a efectos oportunos, firman el presente documento en Badajoz, a 4 de marzo de 2011.

Fdo.: Dra. Carmen Barriga Ibars

Fdo.: Dr. Javier Cubero Juárez

AGRADECIMIENTOS

Siempre me pareció que sería una tarea sencilla esta costumbre “literaria” de expresar los agradecimientos al finalizar un trabajo escrito, ya que simplemente sería extrapolar a un papel aquellos sentimientos que te han surgido durante todo el proceso de realización de dicho trabajo. Nada más lejos de la realidad, pues se trata de expresar la gratitud que uno tiene con todas aquellas personas que le han facilitado realizar esta experiencia.

No quisiera que estos sentimientos quedaran en simples palabras. Podrían parecer efímeros y se podría dudar de la durabilidad de los mismos. Espero que no se vacile de los míos, ya que la deuda que tengo con las personas que enumeraré a continuación, rebasa con creces su relación puntual con este trabajo.

En primer lugar quiero expresar mi reconocimiento a la Dra. Carmen Barriga Ibars, mi directora y profesora, pues aunque ya no asista a sus clases, día a día sigo aprendiendo de ella. Gracias por confiar en mí cuando aún era tu alumna, por tu apoyo incondicional, el cual me has brindado desde el primer día, por tener en cuenta mis opiniones y por tus intervenciones en momentos críticos que, aún sin ser evidentes en el texto, han sido igualmente fundamentales. Aún me parece sorprendente tu accesibilidad y bondad, ya que no es usual encontrarse con una persona de tan dilatada experiencia científica y soltura académica y que además no tenga reserva alguna a la hora de impulsar a sus alumnos y colaboradores. Gracias de todo corazón por ser como eres.

El Dr. Javier Cubero es la persona que más ha sufrido las consecuencias de la elaboración de este trabajo, a la que más horas le he robado y uno de los que quizá más se ha alegrado de la finalización del mismo. Desde la búsqueda del tema, hasta los últimos días de formato, ha habido entremedio innumerables horas de apoyo, consultas, discusión, presión, elaboración, implicación, rigor metodológico... Sin duda alguna, sin su colaboración y dirección todo esto nunca hubiera llegado a buen puerto. Muchas gracias por todo, por enseñarme todos los conocimientos necesarios para “aprender a volar” y sobre todo por tu paciencia conmigo, nunca olvidaré tus recomendaciones. Este trabajo también es tuyo.

Me gustaría por tanto, transmitir mi más profundo sentimiento de admiración y gratitud a mis dos directores, por su eterna paciencia y entrega al permitírmelo casi todo, pues todo lo que han hecho y siguen realizando, sé que ha sido y es en mi beneficio.

Quisiera también expresar mi agradecimiento a los doctores Ana Beatriz Rodríguez Moratinos y José Antonio Pariente Llanos. Gracias por vuestra confianza desde el principio (e incluso de mucho antes), por la transmisión de conocimientos, por vuestros ánimos y optimismo en los momentos más bajos y por vuestros consejos profesionales y personales. Mil gracias.

A mis compañeros de laboratorio, Lourdes Franco y Rafael Bravo, también les estoy más que agradecida, pues me queda muy claro que cualesquiera que sean nuestros logros, alguien siempre nos ayudó a conseguirlos.

A todos mis compañeros del departamento, entre quienes destaco al Dr. Sergio D. Paredes. Gracias por aportarme la claridad necesaria en las innumerables ocasiones en las que he requerido tu ayuda, pues además de despejarme "las nubes", me quedaba la tranquilidad del trabajo bien hecho; y mucho más de agradecer es tu compañía, que hace todo mucho más llevadero y agradable.

También quiero destacar al Dr. Iñaki Bejarano, y a los doctorandos María Garrido, Javier Espino, David González, Ana M^a Marchena y Cristina Carrasco, quienes me han ayudado en diversos momentos de esta andadura y con quienes también tengo una complicidad especial. Gracias por crearme un excelente ambiente de trabajo y hasta divertido, incluso en los momentos menos agradables. Me quedan unos magníficos recuerdos y sé que también vuestra amistad.

A Elena Circujano la veo como la piedra angular del departamento. Gracias por realizar un trabajo brillante, tanto en la gestión administrativa como en otros casos. Es admirable tu carácter afable y cómo irradias serenidad y alegría a los que te rodeamos.

He de reconocer que cuando decidí realizar mi primera estancia en el extranjero, surgieron algunos miedos y dudas. Bien por ser algo nuevo tanto para mí como para quienes me rodean, bien por el país elegido: México. Sin embargo, no he estado de nada más orgullosa en toda mi vida.

Me siento muy afortunada de haber sido tutorizada por la Dra. Ivette Celdas de la Universidad Nacional Autónoma de México (México D.F., México). Es de admirar su excelencia científica así como su solidaridad. Gracias a ella recuerdo esta etapa como algo enormemente fructífero, ya que pude madurar bastante en el terreno científico, abriéndome camino hacia nuevos proyectos, permitiéndome participar activamente mediante los seminarios semanales así como dándome la responsabilidad de iniciar algunas investigaciones, las cuales me llenaron de satisfacción profesional, pero también personal. Así conocí a mis compañeros mexicanos, los licenciados Valeria de los Santos, Óscar Hernández, Marisol Rodríguez, Marisol Ramos, Alma Rueda, Nancy Velasco y todas "las chicas de la leche". A todos vosotros, mi más sincero agradecimiento, pues habéis formado parte de los mejores 3 meses de mi vida.

A la familia de los Santos Solís, por haberme acogido como su propia hija. Dándome todo el cariño necesario y mostrándome la infinita riqueza de su corazón. Os llevo siempre conmigo.

I would like to thank to Prof. Jaipaul Singh for having left myself to be collaborating at his laboratory at the University of Central Lancashire (Preston, United Kingdom). Thank him also for looking for my accommodation during my stage in Preston.

Special thanks to Prof. Florian D. Zepf, from the University of Aachen (Germany) and all my colleagues there: Katrin Helmbold, Sarah Bubenzer, Claudia Cívai, Tilman Gaber, David Baumann and Eva Lotte. They have accepted me from the beginning like one of them. Thanks for your professional and personal help, your friendship and the good moments we have spent together. I will face this new time in my life with enthusiasm and confidence knowing that you are there. Ihr seid super!

No quisiera olvidarme en estos momentos de todo el profesorado que he tenido, bien desde el colegio hasta mi etapa universitaria, todos ellos han influido –en mayor o menor medida– en mi madurez académica. Me gustaría destacar a la profesora Consuelo Da Silva quien, con sus clases magistrales en el colegio, despertó en mí la curiosidad e ilusión por esta disciplina.

Es de agradecer también la colaboración de todas aquellas madres que han donado de manera desinteresada muestras de su leche para el desarrollo de esta investigación, y el esfuerzo realizado a la hora de la extracción, sobre todo durante las incómodas horas de la madrugada.

A mi ámbito más personal, mis amistades, quienes siento como mi propia familia, por sus llamadas, por ser siempre partícipes de mis preocupaciones y por estar dispuestos a ayudarme y a compartir los mejores y peores momentos de mi vida. Entre ellos, un particular reconocimiento a M^a José Coronado por su valiosa amistad y talento al ilustrar con su arte esta tesis.

¿Qué sería esta sección sin los agradecimientos a la familia? No hay que caer en el error de que, por dejarlos en el último lugar, son los menos valorados. Sin ir más lejos, quizá sean estos últimos párrafos los más difíciles de redactar, ya que van dirigidos hacia las personas más importantes en mi vida, y me parece tan pobre todo aquello que les pueda decir... Toda referencia hacia ellos me parecerá poco.

Me siento muy afortunada de la familia que tengo, comenzando por mis padres, que son un claro ejemplo a seguir tanto en lo personal como en lo profesional. Ellos han sido claves para el fortalecimiento de mi carácter, para darme una perspectiva mucho más amplia de la vida, enseñándome a ser cautelosa, sin dejar de ser por ello auténtica.

A ti mamá he de agradecerte el gran ejemplo que eres para mí a seguir, por tu carisma, tu profesionalidad, tu dedicación a nosotros, por la paciencia que has tenido cuando he antepuesto otras cosas a vosotros y sobre todo por la enorme fuerza de voluntad que tienes. Espero algún día igualarte aunque solo sea un poquito. Tú eres, sin duda alguna, el pilar que nos sostiene a todos. Te quiero muchísimo.

A mis hermanos, Carmen y Javier, quienes son fundamentales en mi vida por el cariño y los buenos momentos que me dan. Cada día aprendo a ser mejor persona gracias a vosotros, es mi responsabilidad ser vuestro mejor ejemplo a seguir. Ojalá no os decepcione jamás.

A mis tíos, Rafael y María, y a mi primo Nacho, por preocuparse por mí, por saber dar siempre sin esperar nada a cambio.

A mis abuelos, de quienes puedo decir que han sido mis "segundos padres" pues se han implicado tanto en mi educación como el que más. Gracias por la estabilidad que dais a mi vida, por llevar tantos años aguantándome día y noche y sobre todo por ser los mejores psicólogos que una persona puede tener. Sois una fuente de motivación y también sois precursores de este logro, sin vosotros jamás hubiera llegado hasta donde lo he hecho. Os quiero mucho y espero seguir alcanzando metas para que estéis orgullosos de mí.

Quiero cerrar esta sección agradeciéndole a mi padre TODO, pues es el mejor espejo en el que reflejarse para querer avanzar. Al igual que Virgilio se pasó la vida retocando y perfeccionando su Eneida, ha sido mi padre quien más me ha influido para ser como soy.

Gracias por ser el mejor padre que se puede tener, por darme tu cariño y comprensión junto a mamá cuando lo he necesitado, por todas las noches que has quedado conmigo estudiando y cómo no, por tu aportación para el desarrollo de este trabajo. Gracias por ser un excelente profesional y un pensador inagotable, de ti he aprendido lo que es el “amor incondicional al trabajo” y quien me ha inculcado, desde bien pequeñita, ese espíritu científico y carácter explorador que tanto se requiere en este campo. Ahora que finalizo la primera etapa del camino, siento que cada vez estoy más cerca de poder llamarte “compañero”. Sólo deseo que algún día puedas sentirte tan orgulloso de mí como yo lo estoy de ti. Te adoro papá.

Este trabajo ha sido subvencionado con diversas ayudas por parte del Grupo Ordesa, los fondos FEDER, la Junta de Extremadura y la Universidad de Extremadura.



1. INTRODUCCIÓN	Pág. 1
1.1 INTRODUCCIÓN A LA LACTANCIA MATERNA	Pág. 3
1.1.1 PREVALENCIA ACTUAL DE LA LACTANCIA MATERNA EN ESPAÑA	Pág. 9
1.1.2 LACTOGÉNESIS	Pág. 11
1.1.3 COMPOSICIÓN DE LA LECHE HUMANA	Pág. 16
1.1.3.1 Tipos de leche	Pág. 17
1.1.3.2 Componentes de la leche humana	Pág. 18
1.2 CRONOBIOLOGÍA Y RITMOS CIRCADIANOS	Pág. 25
1.2.1 INTRODUCCIÓN A LA CRONOBIOLOGÍA	Pág. 25
1.2.1.1 Ritmos circadianos	Pág. 28
1.2.2 CRONOBIOLOGÍA COMO MÉTODO DE ESTUDIO	Pág. 29
1.2.3 CRONONUTRICIÓN: COMPONENTES QUE INTERVIENEN EN EL SUEÑO/VIGILIA	Pág. 31
2. OBJETIVOS	Pág. 37
3. MATERIALES, MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE CADA UNO DE LOS OBJETIVOS.....	Pág. 47
3.1. CALCIUM INTAKE NUTRITIONAL STATUS IN BREASTFEEDING WOMEN	
3.2. A NEW ANALYTICAL TECHNIQUE IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS: STUDYING THE LEVELS OF NUCLEOTIDES IN HUMAN BREASTMILK	
3.3. THE POSSIBLE ROLE OF HUMAN MILK NUCLEOTIDES AS SLEEP INDUCERS	
3.4. ANALYSIS OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY IN HUMAN MILK, DAY VS. NIGHT	
3.5. NITROGEN AND PROTEIN CONTENT ANALYSIS OF HUMAN MILK, DIURNALITY VS. NOCTURNALITY	

- 3.6. *SCREENING FOR HUMAN MILK AMINO ACIDS BY HPLC-ESI-MS/MS*
- 3.7. *EVOLUTION OF THE CIRCADIAN PROFILE OF HUMAN MILK AMINO ACIDS DURING BREASTFEEDING*
- 3.8. *CHRONOBIOLOGY IN THE COMPONENTS OF THE BREAST MILK*
- 3.9. *NOCIONES EN ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN INFANTIL DURANTE EL PRIMER AÑO DE VIDA*
- 3.10. *VALORACIÓN NUTRICIONAL EN LACTANTES DE ENTRE 8 A 12 MESES DE VIDA*

4. DISCUSIÓN Pág. 149

5. CONCLUSIONES Pág. 161

6. BIBLIOGRAFÍA Pág. 171

*“Que tu medicina sea tu alimento
y que tu alimento sea tu mejor medicina”.*

Hipócrates de Cos, s. IV a.C.

*“Let your food be your medicine
and your medicine be your food”*

Hippocrates of Cos, 4th century B.C.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN A LA LACTANCIA MATERNA

El origen de la lactancia materna es tan antiguo como el origen de la humanidad y en los seres vivos, desde que existen los mamíferos en la Tierra. La lactancia materna es el fenómeno biocultural por excelencia y está íntimamente unida al niño durante los primeros años de su vida. Sin ella, probablemente la especie humana no hubiera podido superar los primeros meses de vida.



■ **Figura 1.** Bronce etrusco de la Loba Capitolina (Vulca, s. V a.C.), símbolo representativo de la lactancia y de la protección.

Para empezar debemos considerar al hombre como un mamífero. Hay más de un millón de especies animales descritas en la Tierra, y los mamíferos forman parte de menos del 0,5% de ese total (alrededor de 4300 especies). En la historia de la evolución, podemos decir que son relativamente unos "recién llegados", y aunque son pocas las especies respecto del total, éstas ejercen una fuerza sobre el ambiente desproporcionada.

Dentro del Phylum Chordata, los mamíferos están agrupados junto a las ascidias, peces, anfibios, reptiles y aves entre otros, todos ellos unificados por características anatómicas como el soporte del cuerpo, la transmisión nerviosa y la respiración. Así, la columna vertebral vuelve a agrupar a los peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos dentro del Subphylum Vertebrata.

La mayoría de la información que tenemos sobre la evolución animal procede de los fósiles. Sin embargo, éstos no nos dan la información necesaria para distinguir a los mamíferos modernos.

Podemos decir de los mamíferos que son animales portadores de mamas (de ahí el término "mamífero"), lactogénicos, hirsutos, homeotermos, que nutren a su descendencia con leche y que son animales de sangre caliente. De todas ellas, la característica más importante para diferenciarlos de los reptiles es la homeotermia. Así, en periodo de actividad, la mayoría de los mamíferos mantienen una temperatura corporal entre 35-38 °C. El cuerpo recubierto de pelo, además les sirve de aislante.

La producción de leche en los mamíferos para el mantenimiento de sus crías depende mucho de la estabilidad de la temperatura, siendo ésta necesaria para un correcto funcionamiento de las glándulas mamarias.

El nacimiento marca el comienzo, pero también es el fin. Para el recién nacido, es el comienzo de su vida y para la madre es el fin del periodo de gestación. Así se acaban los cuidados prenatales para dar paso a los cuidados postnatales. La nutrición del recién nacido vendrá en forma de leche a través de las mamas de su madre [1].

Es bastante complicado encontrar referencias históricas sobre la práctica del amamantamiento en la Edad Antigua. Aún así, los datos que podemos encontrar son breves descripciones hechas por unos pocos escritores sobre salud infantil.

Durante la mayor parte de la historia, no se ha encontrado un sustituto eficaz de la leche materna, pero ya desde bien antiguo se le intentaba buscar alguno. Así, en el papiro egipcio encontrado en Tebas por Ebers (principio de la XVIII dinastía, 1587-1328 a.C.), se describen algunos métodos para estimular el flujo de leche en mujeres lactantes y también para clasificar la leche como buena o mala.

En la antigüedad, era la religión o la mitología quienes intervenían en cada etapa de la vida, y por tanto quienes establecían las pautas del día a día. Ya figuraba la leche como elemento fundamental para la existencia del hombre y esencial para la procreación. Así, los judíos en la Edad Antigua obligaban a que se diera el amamantamiento, siendo castigadas las nodrizas y quienes usaran lactancia artificial.

Además de esto, hay otras referencias a la leche como la del Antiguo Testamento, cuando Sara amamantaba a su hijo Isaac, el cual tuvo junto a Abraham cuando éste tenía 90 años.

En la mitología romana está la historia de Rómulo y Remo, quienes fueron colocados por su madre (Rea) dentro de una cesta en el río Tíber, a fin de evitar su asesinato. La cesta encalló a unos 20 Km. de la desembocadura y se dice que fueron amamantados por una loba, hasta que un pastor los encontró (Figura 1).

También hay algunas referencias en las recetas que prescribían los médicos egipcios (los de mayor reputación en la antigüedad):

Carne de lagarto

Sangre de murciélago

Matriz de gato

Estiércol de cocodrilo

Semen y testículos de burro

Vulva de perro

Leche de mujer

En muchas ocasiones, las madres biológicas no podían alimentar a sus hijos debido a que éstas enfermaban, morían o tenían que trabajar. La necesidad de alimentarlo por otras vías se vio solucionada con la aparición de las nodrizas. Estas mujeres, ya desde las civilizaciones más tempranas, eran quienes alimentaban a aquellos bebés que no tenían otro medio para nutrirse. Sin embargo, las nodrizas estaban mal vistas por los hebreos.

Sorano de Éfeso (93-138 d.C), médico griego que vivió en Roma, escribió sobre las enfermedades de las mujeres embarazadas. En su sección pediátrica, valoraba la profesionalidad de las nodrizas.

Además, trataba las enfermedades de los lactantes a través de éstas, así por ejemplo cuando el bebé tenía diarrea, se le administraba a la Nodriz a un astringente y si el niño estaba con estreñimiento, se le daba a la nodriza un laxante. Seguramente, Sorano fue el primer “investigador” que se adentró en cómo conocer y cómo profundizar a través de la nutrición, en los sistemas fisiológicos.

Desde la Era Cristiana hasta la Edad Media, poco hay documentado de los cuidados que impartían las nodrizas. La medicina occidental estaba tildada como “misteriosa” y quedaba relegado su uso a los monjes y sacerdotes, quienes abandonaron gradualmente los conceptos griegos y romanos [2].

En la Inglaterra del Medievo había un gran control durante el periodo perinatal, regulando también la higiene de las mujeres embarazadas, lo que incluía la alimentación y el modo de vida antes y después de que el bebé naciera junto a las necesidades inmediatas del neonato [3].

Cuando la madre no podía cuidar a su hijo, éste era enviado con una nodriza y posteriormente a un monasterio, a un convento de monjas o a trabajar como criado o esclavo para otra familia. Además era muy común en estos casos el infanticidio, llegando a una crueldad extrema con estos niños, quienes podían usarse como “frisbees” (los tiraban al aire), esclavos o simplemente eran abandonados. Las nodrizas podían amamantar a la vez a varios lactantes, lo que les provocaba tener los pechos agrietados, infecciones e incluso enfermedades [4].

Durante el periodo Isabelino [5], las señoras enviaban a sus hijos a las nodrizas hasta los dos años de edad, la cual era la edad propicia para el destete. Las familias ricas contrataban a una nodriza, llegando en ocasiones a abandonar a sus propios hijos con tal de llevar una vida más lucrativa. Se llegaba a tal extremo en donde podía encontrarse “familias” en las que los hijos no se asemejaban a nadie.

Se consideraba al amamantamiento como algo indigno, propio de la clase baja o de los animales. Es de esta manera, como se pone de moda la “lactancia mercenaria” por medio de las nodrizas o madres de leche. El uso de las nodrizas continuó durante más de tres siglos, siendo cada vez más condenada por los médicos [6 y 7].

Tras la Segunda Guerra Mundial, se fue abandonando progresivamente el uso de la lactancia materna. Así, en Estados Unidos las cifras de las madres que amamantaban a sus hijos eran prácticamente indetectables.

Esta moda de no practicar la lactancia materna llegó hasta Europa Occidental, después a Europa Oriental y ya por último se exportó a los países menos desarrollados (África y Sudamérica), provocando un aumento en la mortalidad de los lactantes a causa de infecciones respiratorias, problemas gastrointestinales y trastornos hidroelectrolíticos por la preparación incorrecta de los biberones.

Debido a estos sucesos, a finales de los años 70 en los países más desarrollados, se realizaron numerosas campañas de promoción de la lactancia materna (1974 y 1978, por la Asamblea Mundial de la Salud) que no tardaron en obtener buenos resultados.

España no ha sido menos a la hora de sufrir estas variaciones en la prevalencia de la lactancia materna. Aunque no se hicieron muchos esfuerzos en impulsarla durante los 70, sí se pudo observar un incremento en su uso, llegando a unas cifras en la actualidad “aceptables” - alrededor del 80% - (categoría I de la OMS).

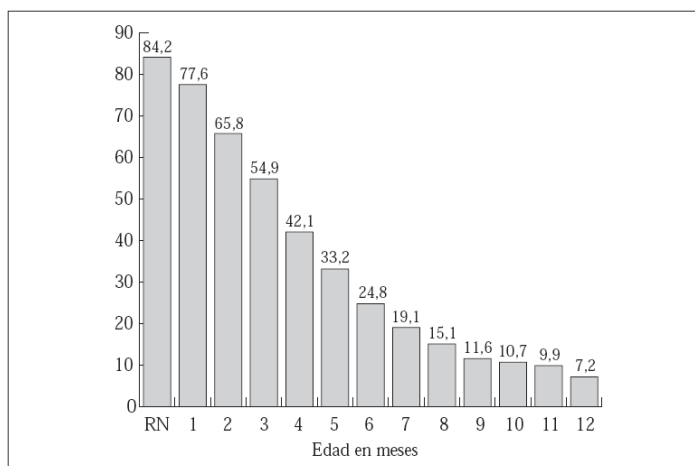
1.1.1 PREVALENCIA ACTUAL DE LA LACTANCIA MATERNA EN ESPAÑA

Aunque en estos momentos no hay un sistema oficial de seguimiento y monitorización de la lactancia materna a nivel nacional, los datos registrados son gracias al esfuerzo de profesionales sanitarios a nivel local, los cuales reproducen con poca fiabilidad la situación real. Aún así, hoy día existe un gran interés por la recuperación de la lactancia materna en la alimentación del lactante en todos los ámbitos sociales, culturales y económicos.

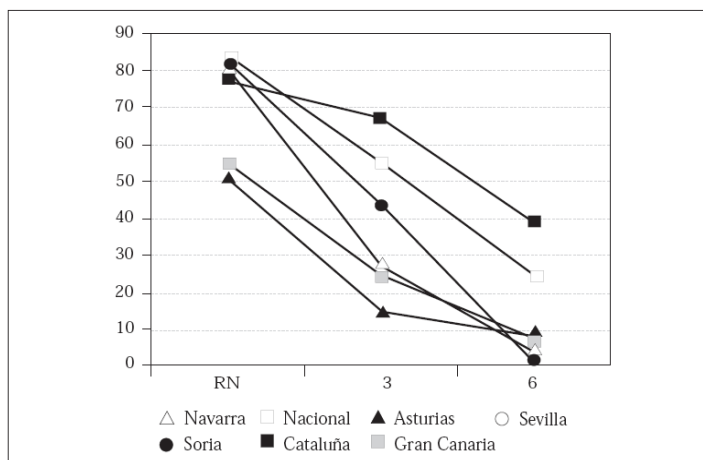
Existen dos publicaciones a nivel nacional que describen la situación de los últimos 20 años: el artículo de Morán Rey (publicado en 1992) que recoge datos de todo lo publicado anteriormente y los datos recogidos en la Encuesta Nacional de Salud (ENS), dirigida por la Dirección General de Salud Pública y que fue publicada en el año 2000. En donde se pueden observar más datos actuales es en la encuesta de 1997, impulsada por el Comité de Lactancia Materna de la AEP (Asociación Española de Pediatría). En ella podemos encontrar los datos recogidos de forma uniforme durante dos semanas, en numerosas comunidades autónomas a lo largo de ese año [8].

Los resultados publicados para las tasas de lactancia materna y su duración (Figuras 2 y 3) siguen demostrando que estamos muy por debajo de las recomendaciones que realizan desde hace años diversas organizaciones internacionales.

Sin embargo, se puede observar que esta disminución ya no es tan rápida y que un 70% de los lactantes con un mes de vida son amamantados, el 54.9% a los 3 meses pero solo un 24.8% a los 6 meses y un 7.2% a los 12 meses.



■ **Figura 2.** Porcentaje de niños con lactancia materna (al menos una toma al día). Datos de García Vera y cols., 2000 [9].



■ **Figura 3.** Datos sobre la lactancia al inicio, a los 3 meses y 6 meses según distintos autores españoles. [9]

1.1.2 LACTOGÉNESIS

La lactogénesis es el comienzo de la secreción láctea y se inicia tras el parto con la disminución de progesterona en la concentración plasmática, acompañado de la prolactina [10].

La lactogénesis I comienza en el 5º o 6º mes de embarazo con el aumento de tamaño de las mamas, y depende del inicio de función de las células alveolares y del acúmulo de secreción en los alvéolos y conductos. Las mamas ya pueden producir leche, encontrándose concentraciones de lactosa y α -lactoalbúmina en sangre y orina [11].

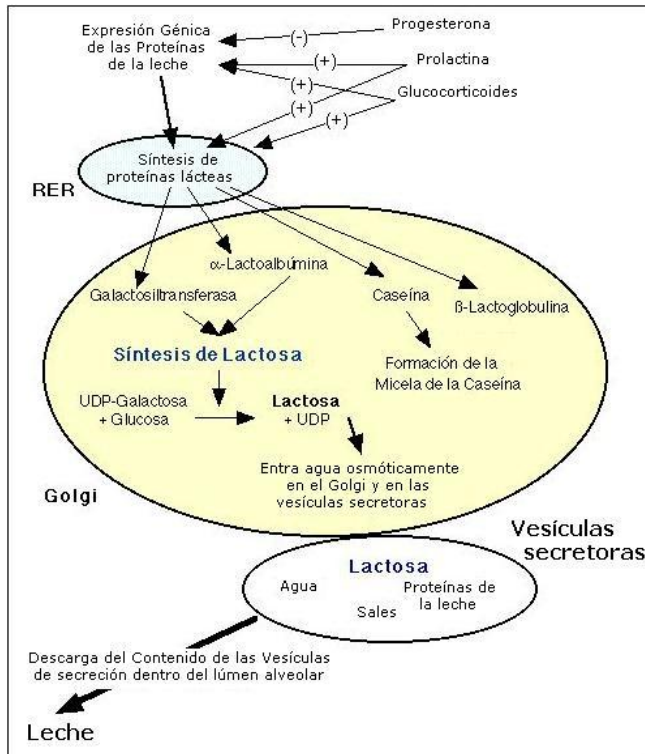
Un 95% de las mujeres lactantes deberían estar capacitadas para amamantar, al menos eso afirman los organismos con autoridad en el mundo de la lactancia. Sin embargo, en el caso de los países desarrollados, las encuestas aportan datos muy inferiores a esta cifra.

La mayoría de las dificultades para amamantar a los bebés surgen durante los primeros días de lactancia y se debe a que la producción de leche tarda en aparecer unos días tras el parto.

Teóricamente, este retraso va en contra de las necesidades del recién nacido, provocando una parada en su ganancia de peso, tardando varios días éste, en recuperarse. A este periodo se le denomina lactogénesis II (subida de la leche), y representa el momento más crítico para el éxito de la lactancia.

Esta iniciación de la secreción de leche es independiente de la succión [12 y 13], pero inmediatamente aumentan los niveles de prolactina tras ella, incrementándose los niveles de esta hormona a medida que la succión se hace con más asiduidad [14].

Hasta el momento del parto, la producción de leche en grandes cantidades está inhibida por la progesterona. Esta inhibición es tan poderosa, que incluso pequeños restos placentarios retenidos pueden demorar el proceso de producción de leche en el postparto [15].



- Figura 4. Diagrama de la secreción de leche.** Las hormonas asociadas al parto (disminución de la progesterona y aumento de glucocorticoides y de prolactina) conducen a la transcripción del gen de la α -lactoalbúmina. El mRNA de la α -lactoalbumina se traduce en el RER y la proteína de la α -lactoalbúmina actúa junto con la galactosiltransferasa en el aparato de Golgi para la síntesis de la lactosa. En la síntesis de la lactosa, entra osmóticamente el agua dentro del Golgi y de las vesículas secretoras. Este proceso permite la secreción de grandes cantidades de leche y es la manifestación más obvia de la lactogénesis II. Al mismo tiempo, la síntesis de otros componentes de la leche se ve incrementada. [10]

La succión suprime el efecto inhibidor de la progesterona sobre la secreción de la leche (promovida por la prolactina), y por tanto si la succión no llega a producirse, hay un descenso de la lactogénesis. El incremento de los niveles de prolactina, favorece la actuación de enzimas relacionados con la síntesis de proteínas lácteas y la lactosa [16]. A la media hora del parto, el niño ya podría ser amamantado, pues ya hay respuesta [17].

El efecto inhibidor de los estrógenos sobre la lactogénesis no está del todo aclarado, pero se sabe que disminuyen la cantidad de prolactina incorporada a las células del alvéolo mamario, impidiendo el aumento de receptores de prolactina que normalmente ocurre durante la lactancia [18]. La prolactina dentro de la célula alveolar estimula la síntesis de la lactoalbúmina y por lo tanto la síntesis y secreción de la lactosa (Figura 4).

Durante la lactancia, los receptores para progesterona desaparecen de la glándula mamaria, lo que explica por qué la progesterona no tiene un efecto supresor de la lactancia una vez que el proceso está establecido [19].

La secreción de la prolactina viene regulada por el hipotálamo por factores estimuladores e inhibidores [20 y 21]:

- *Factores estimuladores: La serotonina y sus precursores y la tirotrópina, así como los antagonistas de la dopamina y los depresores centrales de las catecolaminas.*
- *Factores inhibidores: Los bloqueadores de la serotonina, dopamina y noradrenalina, la ergotamina y los anticonceptivos orales con alto contenido en estrógenos.*

La oxitocina es la encargada del descenso de la leche y es secretada por la pituitaria posterior como respuesta a los impulsos nerviosos del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, siendo éste activado por la estimulación de los receptores mecánicos del pezón. Se produce hiperemia en la glándula mamaria, activa las células mioepiteliales que rodean los alvéolos y la leche es inyectada en los conductos terminales [22].

El reflejo del descenso de la leche está influido por factores psicológicos [17 y 24]. Así por ejemplo, el simple hecho de escuchar el llanto del lactante u otros estímulos cognitivos hace que se expulse leche. La oxitocina es la hormona de la ternura, hace que la madre y el niño se “enamoren”.

También se ha relacionado la acción de la oxitocina con el desarrollo de la conducta materna y las interacciones madre-hijo [23 y 25].

Se han propuesto dos patrones de mecanismo hormonal durante la lactogénesis [26]:

- *Periodo corto de amamantamiento: Aumento de los valores basales de prolactina sérica durante 1-3 meses. Tras cada tetada se produce un pico de prolactina. Es decir, hay secreción pulsátil.*
- *Periodo largo de amamantamiento: Los valores basales de prolactina sérica están elevados durante más de un año y ello depende del alto número de tetadas que da el lactante al día. Se mantienen altos los niveles.*

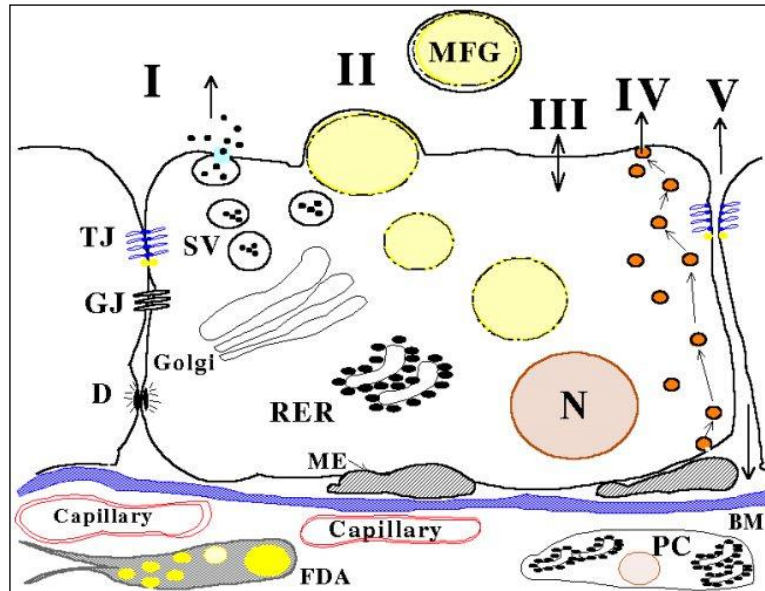
La frecuencia de succión también tiene influencia sobre la secreción pulsátil de oxitocina.

Se han emitido hipótesis sobre el papel del óxido nítrico al comienzo de la lactogénesis. La tetrahidrobiopterina (forma reducida de la biopterina) puede actuar como cofactor para facilitar la síntesis del óxido nítrico, y debe tenerse en cuenta que la biopterina es sintetizada en la glándula mamaria. Por tanto en la lactogénesis, estaría también involucrado el óxido nítrico, originando los cambios necesarios en la glándula mamaria para la lactancia [27].

En la eyección de la leche actúan tanto los receptores de las células mioepiteliales, como mecanismos indirectos que inducen relajación de los conductos periféricos, liberando péptidos neurogénicos como el polipéptido intestinal vaso activo (VIP) o el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Ambas sustancias contribuyen a la relajación de las células musculares lisas [23].

El mecanismo de la secreción láctea tiene cinco vías principales. Se deben considerar los siguientes aspectos (Figura 5) [28]:

- I) Mecanismo excitotónico responsable de la secreción de la mayor parte de las proteínas lácteas, lactosa, citrato y calcio.*
- II) Vía para la secreción de la grasa láctea encapsulada en la membrana plasmática.*
- III) Vía representada por canales. A través de la membrana apical es permeable al agua, sodio, potasio, glucosa y cloro.*
- IV) Mecanismo transcitótico responsable para la secreción de la inmunoglobulina A secretora y las hormonas.*
- V) Mecanismo de la vía paracelular que está cerrado durante la lactancia y abierto durante el embarazo.*



- **Figura 5. Vías de secreción del epitelio mamario.** Los componentes de la leche pasan de las células secretoras a la luz de los alvéolos por cinco vías: I - Exocitosis, II - Secreción de grasas, III - Secreción de iones y agua, IV - Transcitosis y V - Vía paracelular. N: Núcleo; TJ: zonula ocludens; GJ: uniones Gap; D: desmosoma; SV: vesícula secretora; FDA: adipocito saturado; PC: célula plasmática; BM: membrana basal; ME: Sección de la célula mioepitelial; RER: Reticulo endoplasmático rugoso; MFG: Glóbulo de grasa. [29]

1.1.3 COMPOSICIÓN DE LA LECHE HUMANA

Cada especie tiene una composición láctea diferente, adaptada a las necesidades digestivas, nutritivas y de crecimiento que demandan sus crías. Por ejemplo, los mamíferos de crecimiento rápido tienen una leche rica en proteínas y la leche de aquellos animales de zonas más frías es más rica en grasas. Por otro lado, la leche humana tiene mucha cantidad en hidratos de carbono, sustancias que son necesarias para el desarrollo cerebral.

Podemos decir que la leche humana es el alimento óptimo e inigualable para el lactante. Aporta todos los elementos nutritivos que necesita el niño durante los primeros meses de vida, siendo además un alimento esencial hasta los dos años, complementándolo con otros alimentos no lácteos (beikost).

La leche humana no es solo un alimento, es un fluido vivo y cambiante, que se puede adaptar a los diferentes requerimientos del lactante a lo largo del tiempo (modifica su composición y su volumen) así, como a lo largo del día, facilitando de esta forma, la adaptación a la vida extrauterina del nuevo ser.

Dentro de la composición de la leche materna, hay que distinguir los aspectos diferenciados que se refieren a los cinco primeros días de la lactancia y que constituyen la leche calostrada, y a la producción de leche madura, pasados ya los 15 días de adaptación de los mecanismos de la lactogénesis.

1.1.3.1 Tipos de leche

Los diferentes tipos de leche que son secretados en la glándula mamaria son el calostro, la leche de transición, la leche madura y la leche pretérmino.

- Calostro: Durante el último trimestre de la gestación se ha ido acumulando en el lumen de los alvéolos una sustancia llamada precalostro, formada principalmente por exudado de plasma, células, inmunoglobulinas, lactoferrina, seroalbúmina, sodio, cloro y una pequeña cantidad de lactosa. El calostro es la leche secretada durante los 4-5 días posteriores al parto. Tiene aspecto amarillento y espeso, de alta densidad y poco volumen (2-20 ml por toma).

- Leche de transición: Es la leche que se produce entre los días 4º y 15º posterior al parto. Al 4º o 6º día se produce un incremento brusco en la producción de leche (subida de la leche), que sigue aumentando hasta alcanzar un volumen de 600-700 ml/día. Esta leche es de composición intermedia y varía día a día hasta alcanzar los niveles de la leche madura.

- Leche madura: Es la leche secretada a partir de las dos semanas tras el parto. Tiene una gran variedad de componentes nutritivos y no nutritivos. Su volumen promedio es de 700-900 ml/día durante los 6 primeros meses postparto. Antes de la hipogalactia, se pasa por una fase calostrual.

- Leche pretérmino: Cuando se produce un adelantamiento del parto (parto pretérmino), se produce durante un mes una leche con una composición diferente, adaptada a los requerimientos del prematuro.

1.1.3.2 Componentes de la leche humana

Comparando la leche calostrual con la madura, hay que considerar diferentes aspectos en relación con su composición en hidratos de carbono, proteínas, nitrógeno total, nitrógeno no proteico (NNT), grasas, minerales y vitaminas (Tabla I).

- Hidratos de carbono (HC): La lactosa es el HC predominante, con cantidades promedio de 6-7 g/100ml. Los valores de la lactosa se han correlacionado negativamente con los de sodio y cloro, dependiendo de los aumentos en la permeabilidad del epitelio mamario [31]. La calidad de la alimentación materna no afecta a la concentración de lactosa, ya que se han encontrado altos niveles de ésta incluso en mujeres malnutridas y vegetarianas [32].

Podemos ver disminuidos los niveles de lactosa cuando llegan los HC en la dieta a un 65% del valor energético total diario [33]. Los valores de lactosa varían a lo largo de la lactancia. También hay glucosa y galactosa.

*- **Proteínas:** Los dos componentes principales son la caseína (β y κ) y el lactosuero (α -lactoalbúmina, lactoferrina, lisozima, albúmina sérica, proteínas ligantes de folato, vitamina B₁₂, vitamina D, tiroxina y coleocistoquinina).*

Hay claras diferencias en las concentraciones de las diferentes leches. Así, en la experimentación con animales, se ha podido demostrar que el calostro induce el crecimiento de la mucosa entérica, siendo crítico para el desarrollo intestinal [34].

La caseína constituye entre el 10-50% del total de proteínas y el lactosuero entre el 50-90%. Las proteínas derivadas de las membranas del glóbulo de grasa materna y de las células de la leche materna son del 1-3% del total proteico de la misma leche [35].

La función principal de la caseína sería el aporte de aminoácidos, calcio y fósforo al lactante. Es posible que los caseín-fosfolípidos influyan en la absorción de fracciones de hierro, cinc, cobre y manganeso en la leche humana que va unido a la caseína.

La concentración de caseína β sería de un 12-15% del total de las proteínas de la leche humana mientras que la caseína κ sería del 9-12 %. El descenso que se produce es mayor en el paso de calostro a leche madura para la caseína κ que para la β .

Componente	Calostro/100 ml	Leche madura/100 ml
Energía (Kcal)	58	70-75
Agua %	87,2	88
Lactosa g	5,3	7,3
Nitrógeno total mg	360	171
NNP mg	47	42
Proteínas totales g	2,3	0,9
Caseína mg	140	187
Alfa lactoalbúmina mg	218	161
Lactoferrina mg	330	167
IgA mg	364	142
Grasas totales g	2,9	4,2
Ácido linoleico: (% del total)	6,8	7,2
Ácido linolénico		1,00
C20 y 22 poliinsaturados	10,2	2,9
Colesterol mg	27	16
Vitamina A mcg	89	47
Betacaroteno mcg	112	23
Vitamina D mcg	-	0,004
Vitamina E mcg	1280	315
Vitamina K mcg	0,23	0,21
Tiamina mcg	15	16
Vitamina B6 mcg	12	28
Vitamina B12 mcg	200	26
Ácido ascórbico mcg	4,4	4,0
Calcio mg	23	28
Magnesio mg	3,4	3,0
Sodio mg	48	15
Potasio mg	74	58
Cloro mg	91	40
Fósforo mg	14	15
Cobre mcg	46	35
Yodo mcg	12	7
Hierro mcg	45	40
Zinc mcg	540	166

■ **Tabla I.** Comparativa entre la composición del calostro y de la leche madura. [30]

El lactosuero está formado por las proteínas que permanecen solubles tras la precipitación de la caseína. Dentro de ellas, la predominante es la α -lactoalbúmina que constituye el 10-12% del total de las proteínas, contiene además 1% de calcio total de la leche y forma parte de la lactosa sintasa (enzima responsable de la síntesis de lactosa en la glándula mamaria) [36].

La concentración de las proteínas del lactosuero va descendiendo durante la lactancia, es por esto por lo que la relación lactosuero/caseína varía. Así, al principio en el calostro, la proporción de lactosuero es muy elevada, siendo de 90:10, mientras que en la leche madura desciende hasta casi equipararse a la caseína, siendo la relación de 60:40 ó 50:50 [37].

*- **Fracción Nitrogenada No Proteica (NNP)**: Se encuentra representada por fracciones peptídicas, urea, aminoácidos libres, aminoazúcares, amonio, ácido úrico, poliaminas, carnitina y nucleótidos [38].*

La concentración de la NNP en el calostro es de 0,47 mg N/ml, de los cuales un 13% corresponde a péptidos nitrogenados, un 9% a ácido siálico o N-acetil neurámico (NANA) y hasta un 30% de factores no bien identificados. Por el contrario en la leche madura, la concentración de NNP presenta unos valores totales variables de 400-597 mg/l \pm 68 mg/l. De ellos el nitrógeno ureico sería un 25%.

Con respecto a los aminoácidos libres, no se ha concluido que haya relación entre el nivel plasmático y los valores en leche materna. Éstos últimos proceden de la secreción activa por parte de la glándula

mamaria o de una hidrólisis parcial de las proteínas de la leche por parte de las enzimas de la misma.

Los aminoácidos libres con mayor concentración en la leche materna son: glutamato, taurina, alanina y glutamina, siendo un 3-5% del NNP total. La procedencia de este NNP es a partir de productos del metabolismo nitrogenado: urea, creatinina, creatina, ácido úrico y amonio. Por otra parte se encuentra α -aminonitrógeno libre, pequeños péptidos, así como nucleótidos, poliaminas y carbohidratos nitrogenados.

Entre todos los anteriormente mencionados componentes se encuentran los nucleótidos:

Éstos, junto con sus metabolitos, podemos encontrarlos en la leche materna formando parte de numerosos procesos biológicos tales como efectos sobre la flora intestinal favoreciendo la proliferación celular y su diferenciación [39], sobre la inmunidad celular y humoral favoreciendo la actividad de las células Natural Killer (NK) y la activación de macrófagos [40] y sobre las lipoproteínas plasmáticas. También hay un aumento de la cantidad de proteínas y del ADN de la mucosa intestinal [41]. Otras funciones de los nucleótidos se reflejarán en el apartado 3 de la presente introducción.

Como algunos de los componentes anteriormente descritos, el patrón de los nucleótidos es muy diferente de la leche humana al de la leche de vaca, además de variar con el curso de la lactancia [42].

El total de los nucleótidos potencialmente disponibles está integrado por los nucleótidos poliméricos (NDP y NTP), los monoméricos (NMP), los nucleósidos y los derivados de los nucleósidos.

Los nucleósidos libres, monofosfato y difosfato tienen valores de hasta 200 $\mu\text{mol/l}$ en los primeros estadios de lactancia [46].

- **Grasas:** Son el componente más variable de la leche humana ya que sus valores oscilan desde 2g/100ml en el calostro hasta 4-4,5g/100ml en leche madura. De ellas, el lactante obtiene la mayoría de su energía, proporcionando el 40-50% calorías de ellas [47].

Su composición consta de más de un 98% de triglicéridos, 0,7% de fosfolípidos y el 0,5% restante, lo forman los ácidos grasos libres, mono y diglicéridos y el colesterol.

La mayoría de los triglicéridos son ácidos grasos de cadena larga (14-20 átomos de carbono), que contienen al menos 2 o 3 ácidos grasos diferentes. La posición de la esterificación influye en su absorción. Del total en leche humana, un 66% del palmítico se encuentra en posición 2 lo que provoca una mayor absorción que a diferencia de los que podemos encontrar en las fórmulas infantiles, en donde predomina la posición 1,3.

En oposición a los ácidos grasos de cadena larga, los de cadena media (8-12 átomos de carbono) producen menos energía, pero su absorción es más rápida.

Los fosfolípidos son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y esfingomielina. Su función principal es actuar como emulsificantes (mantienen el glóbulo graso en emulsión). Actúan como defensa (gangliósidos: 0,2 mmol/l) y para satisfacer la gran demanda del cerebro y el hígado del recién nacido (colina: 1,28-1,35 mmol/l).

En el caso del colesterol, no se han hallado efectos de la dieta sobre los niveles de colesterol en leche materna. Los niños que tienen lactancia natural, toman más colesterol que los que tienen lactancia artificial e incluso que los adultos. No se han encontrado referencias a que esta ingesta de colesterol influya en el nivel que haya en etapas posteriores al nacimiento.

Los ácidos grasos saturados (sin dobles enlaces) de cadena larga más habituales son el palmítico (16 átomos de carbono) y el esteárico (18 átomos de carbono). Los de cadena media y corta son todos saturados.

El más abundante de los ácidos grasos de cadena larga monoinsaturados (con un único doble enlace) es el oleico.

Los ácidos grasos poliinsaturados (con varios dobles enlaces) de cadena larga son también conocidos como LC-PUFA (Large Chain – Polyunsaturated Fatty Acids), se clasifican en dos familias principales:

- *La familia n-6 con el ácido linoléico (LA, del 8-16% del total de los ácidos grasos en leche materna), precursor del ácido araquidónico (AA, 0,5%) quien a su vez es precursor de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos.*
- *La familia n-3 con el ácido linolénico (ALA), precursor del eicopentaenoico (EPA) y del docosahexanoico (DHA).*

El EPA y el DHA son esenciales ya que no pueden ser sintetizados suficientemente por el recién nacido a partir del LA y ALA. La leche materna es rica en estos ácidos grasos, lo que les proporciona una buena agudeza visual y un mejor desarrollo cerebral que los bebés alimentados con fórmula.

Es curioso que los valores de los ácidos grasos administrados en un estudio a 14 madres, el punto máximo de ascenso correspondía a las 10-14 horas, mientras que para el EPA y DHA se producía a las 24 horas y permanecían elevados durante 3 y 2 días respectivamente. La dieta por tanto influye en la composición de los ácidos grasos de la leche materna [48].

Los que predominan ligeramente en la leche humana son los saturados, seguidos de los monoinsaturados y por último los poliinsaturados, aunque puede variar por la dieta materna. El contenido varía con la lactancia, yendo aumentando el LA y ALA, mientras que el AA y DHA disminuyen durante el primer mes, para posteriormente estabilizar sus niveles a lo largo del resto de la lactancia (se van adaptando a los requerimientos del bebé). Los niveles de LC-PUFA tienden a mantenerse (100mg/Kg./día) [49].

2.1 CRONOBIOLOGÍA Y RITMOS CIRCADIANOS

2.1.1 INTRODUCCIÓN A LA CRONOBIOLOGÍA

Etimológicamente Cronobiología (Kronos= tiempo; bios= vida y logos= ciencia) significa “ciencia que estudia los ritmos biológicos”, pero podemos ampliar esto aún más diciendo que también trata en definitiva, los acontecimientos cíclicos.

La doctrina científica de la cronobiología como tal es bastante reciente, pero su concepto lleva varios siglos cogiendo fuerza.

Ya en la Grecia antigua, el poeta Hesíodo (año 700 a.C.) escribió: “las enfermedades caen en los hombres, unas de día y otras de noche”. También Hipócrates solía aconsejar a los interesados en medicina a investigar las épocas estacionales, así, se debía aplicar un tratamiento u otro dependiendo de la estación en la que se encontraran.

Eine Blumen-Uhr



- **Figura 6.** Imagen correspondiente al reloj floral de Linneo, con el cual puede saberse la hora dependiendo de qué flores estén abiertas o cerradas en el campo.

En la medicina china también se le ha dado mucha importancia al concepto de tiempo y periodicidad, tanto, que estos son los pilares básicos en la escuela del yin y el yang, considerando los ritmos biológicos dentro de sus diagnósticos y tratamientos a enfermedades de muy diversa índole.

Prácticamente todas las civilizaciones antiguas han tenido muy en cuenta al tiempo, incluso a veces llegándolo a relacionar con deidades, por ejemplo el Dios del Sol que en el caso de los egipcios era Ra y para los incas era Kinich Ahau.

*Es curioso como las principales observaciones que se hicieron desde antiguo de los ritmos biológicos, han sido en plantas. De esta manera, no fue hasta 1729 cuando se realizó el primer experimento cronobiológico. Su autor fue un astrónomo llamado Jean Jacques d'Ortous de Mairan, el cual pudo observar y explicar la existencia de ritmos biológicos endógenos aplicados al movimiento de apertura y cierre de las hojas en la especie *Mimosa pudica*, que mantenía extendidas sus hojas durante el día y cerradas durante la noche. Lo curioso es que esta situación ocurría incluso manteniendo a la planta bajo condiciones de oscuridad permanente. Propuso que esto se asemejaba a cuando las personas, aún si saber la hora del día que era, mantenían un patrón de sueño relativamente regular.*

En la 2ª década del siglo XIX, un médico alemán llamado Christoph Hufeland escribió que en todas las enfermedades aparece un periodo regular, y que esto se debía a nuestra cronobiología natural.

La Cronobiología no apareció como una doctrina sólida hasta mediados del siglo XIX de la mano de Laycock y Smith [50 y 51], pero no se desarrolló por falta de tecnología.

Se realizaron investigaciones relacionando algunas funciones fisiológicas a ritmos circadianos, pero no se logró llegar al éxito hasta 1960 cuando Aschoff y Rütger Wever registraron ritmos de temperatura y actividad-reposo en humanos aislados totalmente, deduciéndose que los ritmos endógenos respondían a un período aproximado de 25 horas. Posteriormente se demostró que este ritmo era cercano a las 24 horas [52].

Fue en esa década de los sesenta cuando Halberg estableció las bases de la Cronobiología.

2.1.1.1 Ritmos circadianos

No son lo mismo los ritmos circadianos que los ritmos biológicos. Estos últimos no constituyen un fenómeno casual ni un seguimiento pasivo de las condiciones ambientales, sino que forman parte de una adaptación al entorno que es fundamental para la supervivencia de las especies. Hay algunos términos que hay que tener en cuenta a la hora del estudio en Cronobiología:

- **Ritmo:** *Repetición de una variable biológica con un período constante.*
- **Frecuencia:** *Número de repeticiones por unidad de tiempo.*
- **Periodo:** *Tiempo que tarda en repetirse un ciclo.*

Los ritmos circadianos son aquellos con una frecuencia aproximada a la diaria (es decir, un período cercano a 24 horas).

También existen ritmos ultradianos, en los cuales su frecuencia es superior a la diaria (período inferior a 24 horas) y los ritmos infradianos, con una frecuencia inferior a la diaria (período superior a 24 horas).

En la tabla II se puede observar las diferentes funciones asociadas a determinadas frecuencias de los ritmos biológicos.

Tipo de ritmo	Período	Ejemplo
Ultradiano	0,1 segundo	Electroencefalograma
	1 segundo	Ritmo cardíaco
	6 segundos	Ritmo respiratorio
	60 minutos	Secreciones hormonales
	90 minutos	Alternancia de estados de sueño
Circadiano	24 horas	Actividad-reposo Temperatura corporal
Infradiano	28 días	Ciclo menstrual
	365 días	Hibernación

■ **Tabla II.** Ejemplos de frecuencias en los ritmos biológicos. [52]

En condiciones naturales, los ritmos biológicos se ajustan a los ciclos ambientales, como el de la luz y la oscuridad. Así, podemos hablar de “zeitgeber” (término dado por Halberg) o “marcador de tiempo”, el cual regula los ritmos diarios.

Hay por tanto tres componentes básicos en Cronobiología: zeitgeber (componente exógeno), reloj biológico (componente endógeno) y ritmos biológicos, así como la interacción entre ellos. [53]

2.1.2 LA CRONOBIOLOGÍA COMO MÉTODO DE ESTUDIO

A la hora de poder proceder a un análisis cronobiológico se debe tener en cuenta la gran variedad de métodos, tanto fijos como estáticos, que hay.

Lo ideal sería aquel sistema que nos propicie una disponibilidad directa de los datos en un soporte informático, para obtener así un análisis con el menor esfuerzo y error posibles.

*El método más simple para la caracterización y representación de los datos es el **cosinor**: consiste en ajustar los datos experimentales a una función sinusoidal (coseno) y realizar posteriormente una representación gráfica. Esto es debido a que cuando se analiza un ritmo circadiano del que no se conoce su naturaleza, el modelo matemático más adecuado es el correspondiente a una función sinusoidal.*

En el análisis matemático de los ritmos se utiliza una serie de parámetros que es necesario conocer:

- **MESOR** (acrónimo de *Midline-Estimating Statistic Of Rhythm*) es la media ajustada al ritmo, que representa el valor intermedio entre el valor más alto y el más bajo del ritmo ajustado a una función matemática, generalmente sinusoidal. Se utiliza debido a que la media aritmética simple no representa la media del ritmo ya que puede estar sesgada por la diferente densidad de muestreo. En el modelo sinusoidal, el mesor será igual a la media aritmética de los datos sólo si éstos se han recogido a intervalos regulares a lo largo de todo el ciclo del ritmo.
- **Amplitud**, que se define como la mitad de la diferencia entre el punto más alto y el más bajo del modelo matemático.
- Una vez aplicado el modelo matemático apropiado, la situación del ritmo en el tiempo define la **acrofase** como el punto más alto y al **nadir** como el punto más bajo en relación a una referencia escogida por el investigador.

- El ajuste de los datos a una función sinusoidal (1) se expresa matemáticamente de la siguiente forma:

$$y(t) = y_0 + A \cos(\omega \cdot t + \Phi)$$

Siendo y_0 = MESOR; A = Amplitud; ω = frecuencia y Φ = Desfase.

2.1.3. CRONONUTRICIÓN: COMPONENTES QUE INTERVIENEN EN EL SUEÑO/VIGILIA

Hay determinadas sustancias producidas a nivel endógeno que tienen efectos inductores del sueño. Estos compuestos se encuentran en el organismo durante la fase de sueño y afectan al estado de vigilia. De manera global se les denomina "Sustancias promotoras del sueño" (SPS). Entre ellas podemos destacar en la leche materna:

- **Aminoácidos:** En la tabla III puede observarse un breve resumen sobre algunas propiedades de aquellos aminoácidos que podrían estar relacionados con la función fisiológica del sueño/vigilia.

Aminoácido	E/EC/NE*	Excitador o Inhibidor
Triptófano	Esencial	Inhibidor
Ác. Aspártico	No esencial	Excitador
Ác. Glutámico	No esencial	Excitador
Glicina	Esencial condicionado	Inhibidor
Fenilalanina	Esencial	Excitador
Histidina	Esencial	Excitador
Metionina	Esencial	Excitador
Tirosina	Esencial condicionado	Excitador
Taurina	Esencial condicionado	Excitador

■ **Tabla III.** Breve resumen de los aminoácidos relacionados con el sueño/vigilia.

*E: Esencial; EC: Esencial condicionado; NE: No esencial.

*Así, entre los aminoácidos más importantes a la hora de regular el sueño/vigilia se encuentra el **triptófano**: Aminoácido esencial precursor de la serotonina y de la melatonina, siendo ambos, compuestos que regulan numerosos efectos neurocomportamentales como el apetito, la saciedad, el estado de ánimo, el dolor, y también intervienen en la maduración del cerebro y en el desarrollo de sus funciones. [54]*

Una de sus principales funciones es su efecto inductor del sueño, el cual ha sido ampliamente demostrado tanto en la especie humana como en animales [55]. Son las neuronas serotoninérgicas las que regulan el sueño, siendo la disponibilidad del triptófano el factor limitante de la síntesis y liberación de la serotonina. Así, su mayor nivel se encuentra durante el período nocturno.

Los aminoácidos neutros (leucina, isoleucina, valina, metionina, tirosina, y fenilalanina), comparten el transportador con el triptófano para su acceso al cerebro. Es por esto por lo que la relación entre el triptófano y estos aminoácidos es tan importante.

La abundancia de triptófano será un factor limitante para la síntesis de serotonina, ya que la que se sintetice fuera de este órgano no podrá atravesar la barrera hematoencefálica. De otro modo cuando se bloquea la síntesis de serotonina se producen periodos de insomnio prolongado.

La melatonina es la hormona producida en la glándula pineal durante la fase de oscuridad, siendo su síntesis dependiente de la cantidad de serotonina a nivel cerebral. Interviene directamente en la reducción de la temperatura corporal, produciendo un aumento de la cantidad de sueño de onda lenta y un incremento en la duración del sueño REM. Es muy elevada su producción durante la infancia, hallándose su pico máximo en el segundo año de vida.

Esta concentración va disminuyendo a medida que avanza la edad. Es por esto por lo que las personas ancianas tienen más problemas para conciliar el sueño. [56, 57 y 58]

En el caso de la experimentación en humanos, bebés alimentados con leches infantiles disociadas (leche día/leche noche) con triptófano y otros componentes, consolidaron su ciclo sueño/vigilia.

Cabe también destacar la acción antioxidante de la melatonina que permite proteger al Sistema Nervioso Central para su perfecto desarrollo. [59 y 60]

Los aminoácidos relacionados con el sueño/vigilia son los siguientes:

- **Glicina:** Neurotransmisor inhibitorio. Precursor de serina y purinas. Mayores niveles de concentración en fase REM respecto a la vigilia [43]. Efectos beneficiosos sobre la memoria y la atención, jet-lag y sobre el sueño interrumpido [44].
- **Taurina:** Aminoácido excitador, se adiciona en bebidas energéticas con alto poder excitador. En leche materna se ha datado un aumento de su concentración a las 18h [45].
- **Histidina:** Aminoácido esencial cuyo producto, histamina, es el principal neurotransmisor promotor de la atención en el Sistema Nervioso Central (SNC) y un regulador clave del comportamiento [71].
- **Tirosina y Fenilalanina:** Precursor de noradrenalina y adrenalina, ambas hormonas excitadoras (SNC). Se ha demostrado que la administración de noradrenalina en pacientes con Parkinson induce a una reducción del

- sueño paradójico –REM- [72]. Alcanzan su concentración máxima en plasma al inicio de la mañana y al principio de la noche [73].
- **Metionina:** Aminoácido esencial precursor de acetilcolina. Posible acción de control y mantenimiento de la vigilia. Al igual que la tirosina y la fenilalanina, alcanza su máximo en plasma al inicio de la mañana y al principio de la noche [73].
 - **Ácido aspártico:** Neurotransmisor excitador junto con el glutamato.
 - **Ácido glutámico:** Neurotransmisor excitador, precursor de GABA (ácido γ -aminobutírico). Se ha comprobado un aumento de su concentración en leche materna a las 18h [45].
 - **Cisteína:** es un aminoácido que forma parte del tripéptido glutation (excelente antioxidante), además es precursor de la **taurina**, aminoácido libre que forma parte de las sales biliares y de importante papel en el desarrollo cerebral [61].
- **α -Lactoalbúmina:** Proteína sérica de mayor proporción en la leche humana. Entre su composición se encuentran dos aminoácidos esenciales: triptófano y cisteína.
- **Triglicéridos de cadena media (MCT, por medium-chain triglycerides):** Son una fuente rápida de energía [62] al ser fácilmente hidrolizados por los enzimas digestivos en comparación con los de cadena larga (LCT, por long-chain triglycerides) [63].

Se ha demostrado que la relación MCT/LCT en la dieta de los recién nacidos puede modificar ciertas funciones fisiológicas, entre las que se encuentran la termorregulación y el sueño. También se ha demostrado que incrementa en mayor medida el tiempo total de sueño los MCT respecto a los LCT [64].

*- **Hidratos de carbono:** Favorecen la instauración de la fase de sueño ya que de forma indirecta estimulan la síntesis de serotonina. Esto explica porqué las dietas ricas en HC tienen un efecto relajante e inductor del sueño.*

Presentan la capacidad de modificar las concentraciones plasmáticas de triptófano y aminoácidos neutros. Así, una dieta rica en HC produce un incremento de insulina y en consecuencia una disminución de la cantidad de aminoácidos ramificados, mientras que la concentración de triptófano no se ve modificada de forma importante [65 y 66]. Se incrementa por tanto la relación de triptófano frente a otros aminoácidos en plasma, lo que favorece su entrada en el cerebro y la síntesis de serotonina [67].

*- **Vitamina B₁₂:** Su deficiencia puede producir alteraciones del sueño (al igual que el resto de vitaminas del grupo B). En concreto, ésta ejerce una influencia sobre los ritmos biológicos y favorece la instauración del ciclo sueño/vigilia, mejorando la concentración durante el día y reduciendo la fase de sueño. Esto y su efecto directo sobre la melatonina (incremento) son sus acciones clave [68 y 69].*

*- **Vitaminas antioxidantes:** Son la A, C y E y su papel principal es su función como antioxidante. Además de esto ejercen un efecto estimulante de la actividad diurna, por tanto son favorecedoras de la instauración del ciclo sueño/vigilia.*

- **Nucleótidos:** *Se ha venido demostrando desde hace décadas que algunas de estas sustancias intervienen favoreciendo el sueño desde una acción hipnótica, sedante o incluso inhibidora de la vigilia. Así, tanto la adenosina, guanosina y uridina 5´monofosfato en leche materna expresan un ritmo circadiano [70].*



2. OBJETIVOS

La leche humana, junto con otros fluidos corporales, presenta nutrientes con ritmo circadiano. Así y como se ha venido observando por otros autores, el aminoácido triptófano varía su concentración en la leche materna en función de la hora del día, influyendo así en el ritmo sueño/vigilia del recién nacido.

*Por todo ello, el **objetivo principal** del presente estudio ha sido evaluar la posible existencia de ritmo circadiano de algunos de los componentes de la leche materna, como es el caso de varios aminoácidos y nucleótidos presentes en la misma y que actúan en la regulación del sueño o la activación de la vigilia.*

*Para ello, y como **1^{er} objetivo** se pretende estudiar las variaciones circadianas del nitrógeno total y proteínas que conforman la leche materna, ya que será la base sobre la que se asiente las variaciones de los aminoácidos que las forman.*

2º objetivo: *Basándonos en los diferentes aminoácidos que conforman la leche humana, y distinguiéndolos en función de si son excitadores o inhibidores, o precursores de sustancias neuroactivas con dicho efecto, evaluaremos su variación a lo largo de un periodo de 24h desarrollando un método de análisis rápido y eficaz.*

3º objetivo: *Determinar los niveles cualitativos y cuantitativos de los aminoácidos en leche materna mediante tándem masas, los nucleótidos por electroforesis capilar, nitrógeno total y proteínas por el método Kjeldahl y la capacidad antioxidante por el método del Trolox. Así, y una vez desarrollado el método de detección y tras valorar las concentraciones de los diferentes componentes se comprobará si se ajustan a los obtenidos por otros autores.*

4º objetivo: *Para poder realizar una comparación correcta de las variaciones de sus componentes, se estudiarán éstas en función del desarrollo de la lactancia, es decir, observar las variaciones circadianas durante las tres etapas que la conforman: calostrala, de transición y madura.*

5º objetivo: *Evaluar la posible existencia de ritmo circadiano en los diferentes componentes de la leche materna: nucleótidos, aminoácidos, nitrógeno total y proteínas, y capacidad antioxidante.*

Nuestros resultados nos ayudarán a comprender cómo se regula el ritmo sueño/vigilia en los primeros meses de vida de los bebés, además de ampliar nuestros conocimientos sobre la crononutrición para el recién nacido. Dichos avances serán útiles para el desarrollo de fórmulas artificiales con componentes nutricionales disociados siguiendo los biorritmos que presentan estos nutrientes.



2. OBJECTIVES

Human milk, among other body fluids, nutrients present circadian rhythm. So, as has been demonstrated by other authors, the amino acid tryptophan and the nucleotides adenosine, guanosine and uridine 5'monophosphate vary its concentration in breast milk depending on time of day, thus affecting the sleep / wake rhythm of the newborn .

Therefore, the main objective of this study was to evaluate the possible existence of circadian rhythm of some components of breast milk, as is the case of several amino acids and nucleotides present in equal and active in sleep regulation or activation of wakefulness.

*Our **1st objective** is to study the circadian variations of total nitrogen and protein that makes breast milk as it will be the basis on which to settle the variations of amino acids that form.*

***2nd objective:** Based on the different amino acids that make up human milk, and distinguished according to whether they are excitatory or inhibitory, or precursors of substances with this effect, our aim is to*

evaluate its variation over a 24-h period, and to develop a method for a rapid and effective analysis.

3rd objective: *To determine the qualitative and quantitative levels of amino acids in breast milk by tandem mass; nucleotides by capillary electrophoresis; protein and nitrogen content by Kjeldahl method and antioxidant capacity by TEAC assay (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity). Once developed the detection method and after assessing the concentrations of the different components, it will be checked if they conform to those obtained by other authors.*

4th objective: *To make an accurate comparison of changes in its components, they will be considered depending on the progress of lactation, i.e. circadian variations observed during the three stages that comprise: colostrum, transitional and mature.*

5th objective: *To evaluate the possible existence of circadian rhythm of the different components: nucleotides, amino acids, protein and nitrogen content, and antioxidant capacity.*

Our results will help us to understand how it regulates the cycle sleep / awake in the first months of life of babies, and expand our knowledge of the chrononutrition for the newborn.

These advances will be useful for the development of nutritional components of the artificial formulas which are differentiated according to biorhythms presented by these nutrients.



3. MATERIALES, MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE CADA UNO DE LOS OBJETIVOS:

PREÁMBULO

A continuación exponemos los resultados conseguidos en relación con los objetivos planteados anteriormente. Por razones de concisión y fidelidad al desarrollo experimental, estos resultados se incluyen en el formato original de las publicaciones a las que han dado lugar. En esta Tesis Doctoral no se han incluido datos preliminares o en fase experimental de desarrollo.

Y aunque lógicamente cada artículo contiene su propia discusión, hemos creído apropiado incluir al final de este apartado otro de DISCUSIÓN GENERAL, donde aportamos una visión conjunta de los resultados obtenidos, para poder concebir una visión integrada de los datos aquí presentados.

- I) ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICIÓN:**
- CALCIUM INTAKE NUTRITIONAL STATUS IN BREASTFEEDING WOMEN
- II) JOURNAL OF APPLIED BIOMEDICINE:**
- A NEW ANALYTICAL TECHNIQUE IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS: STUDYING THE LEVELS OF NUCLEOTIDES IN HUMAN BREAST MILK
- III) NUTRITIONAL NEUROSCIENCE:**
- THE POSSIBLE ROLE OF HUMAN MILK NUCLEOTIDES AS SLEEP INDUCERS
- IV) CELL MEMBRANES AND FREE RADICAL RESEARCH:**
- ANALYSIS OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY IN HUMAN MILK, DAY VS. NIGHT
- V) NUTRICIÓN HOSPITALARIA (ACEPTADO, EN PRENSA):**
- NITROGEN AND PROTEIN CONTENT ANALYSIS OF HUMAN MILK, DIURNALITY VS. NOCTURNALITY
- VI) JOURNAL OF FOOD ANALYTICAL METHODS (ACEPTADO, EN PRENSA):**
- SCREENING FOR HUMAN MILK AMINO ACIDS BY HPLC-ESI-MS/MS
- VII) NUTRITIONAL NEUROSCIENCE (EN REVISIÓN):**
- EVOLUTION OF THE CIRCADIAN PROFILE OF HUMAN MILK AMINO ACIDS DURING BREASTFEEDING
- VIII) ANTROPOLOGÍA PORTUGUESA (EN REVISIÓN):**
- CHRONOBIOLOGY IN THE COMPONENTS OF THE BREAST MILK
- IX) ENFERMERÍA GLOBAL:**
- NOCIONES EN ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN INFANTIL DURANTE EL PRIMER AÑO DE VIDA
 - VALORACIÓN NUTRICIONAL EN LACTANTES DE ENTRE 8 A 12 MESES DE VIDA

Análisis nutricional en el aporte del mineral calcio en mujeres con lactancia

Sánchez CL., Rodríguez AB., Sánchez J., González R., Rivero M., Barriga C., Cubero J.

Departamento de Fisiología. Facultad de Ciencias. Badajoz, Laboratorio de Metabolismo. Hospital Perpetuo Socorro. Badajoz, Servicio de Pediatría. Unidad de Neonatología. Hospital Materno Infantil. Badajoz, Dirección General Científica. Grupo Ordesa. Barcelona, España

RESUMEN

Análisis nutricional en el aporte del mineral calcio en mujeres con lactancia

El objeto del presente estudio fue analizar las dietas de 39 mujeres (edad media = 34.3 años; IMC medio = 26.2 kg/m²) sanas y con lactancia exclusiva, mediante Encuesta Dietética de Recordatorio de 24 horas y utilizando el software Dial®, centrándonos en el aporte diario de calcio y vitamina D. La población a estudio se agrupó en función de si su ingesta en calcio era mayor (no restrictivas) o menor (restrictivas) a la Ingesta de Referencia para la Población según la Unión Europea. Los resultados obtenidos revelaron inicialmente que en un 64% de dicha población (restrictivas) el aporte energético seguía una tendencia deficitaria, siendo de 2042.7 ± 458.3 kcal. Además su ingesta de calcio (812.4 ± 211.2 mg/día) fue inferior (p<0.01) a la recomendada, así como la ingesta en vitamina D, en donde su aporte diario también fue deficitario (1.71 ± 1.59 µg/día) respecto al resto de la población (no restrictivas). Tras estos resultados, se puede concluir que un alto porcentaje de estas madres se encuentra por debajo de las recomendaciones nutricionales durante su etapa de lactancia, siendo aconsejable que fueran informadas por los profesionales sanitarios sobre los hábitos alimentarios requeridos en este periodo.

Palabras clave: Lactancia materna, calcio, vitamina D, nutrición.

SUMMARY

Calcium intake nutritional status in breastfeeding women

The aim of this study was to analyze the diets of 39 healthy, lactating women (average age = 34.3 years; average BMI = 26.2 kg/m²) by a 24-hour dietary recall. This investigation was focused on calcium and vitamin D intake. Nutrients were estimated using the software Dial®. These participants were divided into calcium restrictors, defined as calcium intake <1200 mg/day, and non-restrictors (>1200 mg/day). The results showed that 64% of the study population (restrictors) reported a mean energy intake (2042.7 ± 458.3 kcal), calcium intake (812.4 ± 211.2 mg/day) and vitamin D intake (1.71 ± 1.59 µg/day) below the adequate intake level (AI) and lower than non-restrictors estimated intakes (p<0.01). The conclusion of this study is that a high percentage of the lactating women consume a diet below nutritional recommendations during this stage. It is recommended that health professionals should inform these mothers about the correct dietary habits during this period.

Keywords: Breastfeeding, calcium intake, vitamin D intake, nutrition.

INTRODUCCION

Por todos, tanto profesionales de la salud como por la población en general, son conocidos los beneficios que aporta la lactancia materna tanto al lactante como a su progenitora, ya que la leche materna tiene una composición óptima tanto de macro como de micronutrientes (1).

Tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Academia Americana de Pediatría (AAP) y el Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría (AEP) recomiendan la lactancia exclusiva de pecho durante los 6 primeros meses de vida, así como continuar con el amamantamiento durante la etapa de alimentación complementaria ó *Beikost* (2,3).

Aunque aún existe cierta controversia, se han descrito en numerosas publicaciones los efectos de la dieta en la composición de la leche materna, ya que la ingesta de alimentos de la madre puede alterar la concentración de los diferentes nutrientes que componen la leche humana. Estos estudios sugieren que el coste nutricional está directamente relacionado con la cantidad de leche producida, así como con la concentración de sus nutrientes (4-6).

Calcio y vitamina D

Es evidente la demanda de calcio que soporta el organismo de la mujer durante el embarazo debido al anabolismo óseo del embrión (7).

Transcurrido el embarazo y ya durante el periodo de lactancia, dicha demanda continúa debido al proceso de lactogénesis. Además, existe una íntima relación entre la dieta materna y los niveles de macro y micronutrientes que contiene la leche y en el caso particular de este estudio, para el mineral calcio (8). Se ha observado que aquellas madres que ingerían menor cantidad de calcio durante la etapa de embarazo y lactancia, presentaban disminuidos sus niveles en leche madura (8-10). Por ello, existen instituciones como la National Academy of Science (NAS) o la Food and Agricultural Organization (FAO), las cuales recomiendan como Ingesta Aconsejada (IA) para el calcio, 1000 mg/día (11,13), así como las recomendaciones de la Unión Europea, que incrementan este valor para dicha etapa con 200 mg, siendo su Ingesta de Referencia para la Población (IRP) de 1200 mg/día (12,13).

En la revisión bibliográfica sobre suplementación de calcio a la madre durante la lactancia, cabe señalar que existen numerosos estudios a favor de este aporte extra ya que lo avalan como regenerador de la densidad ósea (14-16), además de poder llegar a aumentar a lo largo de la lactancia los niveles de calcio en la leche (17,18).

Además de una correcta administración diaria de calcio, también puede ser determinante una equilibrada ingesta de vitamina D, encargada de la absorción de dicho mineral a nivel renal e intestinal. No obstante, con una exposición al sol dentro de latitudes geográficas próximas al Ecuador, podría permitirse una correcta conversión de su precursor (7-dehidrocoleciferol) a su forma activa, aunque los niveles de ingestión de esta vitamina no sean los apropiados. Las recomendaciones diarias de vitamina D, así como su suplementación en mujeres tanto en periodo de embarazo como en lactancia, fueron descritas por Hollis (18,19).

Existen varias consideraciones a tener en cuenta sobre dicha suplementación vitamínica: bajo lactancia exclusiva, con piel pigmentada y exposición limitada al sol (20, 21). Además, en ciertos casos la suplementación no siempre llega a ser efectiva, ya que como se ha demostrado en algunos estudios, pueden no incrementarse los niveles de calcio en la leche materna a partir de los 4 meses con lactancia (16). Es por esto, por lo que se contempla la alternativa que presenta C.S. Kovacs de suplementación con vitamina D de forma directa al lactante (22).

MATERIALES Y METODOS

Población a estudio

Se reclutaron 75 madres sanas con un mes de lactancia exclusiva en consulta pediátrica hospitalaria y extrahospitalaria del *Servicio Extremeño de Salud (S.E.S.)*. Los criterios de inclusión fueron: no padecer ninguna patología asociada a la lactogénesis, no fumar, de edad comprendida entre 18 y 40 años y con residencia establecida en el área de la ciudad de Badajoz.

Del total de madres contactadas, finalmente abandonaron y no completaron el estudio el 48%, cuyas causas fueron el desinterés y/o cambio de domicilio.

Dicha población a estudio pertenecía a todas las escalas sociales, con una edad e IMC medios de 34.3 años y 26.2 kg/m² respectivamente y con una actividad diaria ligera.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Extremadura, obteniéndose el consentimiento firmado de cada mujer a estudio.

Estudio dietético y nutricional de los hábitos alimentarios

Se recogieron en estas mujeres con lactancia exclusiva, cuestionarios de registro del consumo de alimentos ingeridos durante un día, mediante Encuesta Dietética de Recordatorio de 24 horas (EDR-24h) y frecuencia de consumo de alimentos (FCA) para estimar el consumo habitual de frecuencia diaria de alimentos pertenecientes al grupo de lácteos y sus derivados españoles (23). Para facilitar el análisis de la encuesta propia, se agruparon y tomaron como referentes de las raciones medias que se recogen en el "Rombo de la Alimentación" (24): Leche (225 ml; leche desnatada, semidesnatada o entera), yogures (125 ml; yogur entero, desnatado y de frutas), quesos (35 g; queso curado, semicurado, de bola, mozzarella y parmesano) y queso fresco (60 g).

Se les indicó previamente a dicho colectivo de madres con lactancia exclusiva, las medidas de cantidad y volumen que debían emplear a la hora de completar los cuestionarios. A su vez también se les preguntó sobre su estilo de vida y si mantenían alguna restricción alimentaria.

También se registró el peso y la altura para el estudio antropométrico, obteniéndose el IMC (kg/m²) a partir de estos datos.

El análisis nutricional y dietético se determinó mediante tablas de composición de alimentos españoles (23) y mediante el software *Dial®* (Alce Informática 2008).

Análisis estadístico

Se hallaron la media aritmética (X) y la desviación estándar (DS) de todos los datos.

El estudio de la normalidad se realizó mediante el test de *Kolmogorov-Smirnoff*. Posteriormente se compararon las medias para distribuciones homogéneas mediante el test de la *T-Student* y para el estudio de la correlación lineal se halló el coeficiente de *Pearson*. Se consideraron significativos los datos que presentaran un valor $p < 0.05$. El paquete estadístico utilizado fue SPSS® v.15.

RESULTADOS

Para una mayor comprensión de los resultados se agrupó a la población en estudio en dos grupos respecto a si la ingesta de calcio era mayor (no restrictivas, n=14) o menor de 1200 mg/día (restrictivas, n=25), siendo éste el valor de IRP en la Unión Europea (12,13) para la etapa de lactancia.

En la Tabla 1 se muestran los datos antropométricos de la población estudiada. Puede observarse una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del peso e IMC del grupo de madres con una ingesta restrictiva de calcio, las cuales se encontraban con sobrepeso (27.1 kg/m²) respecto a las que no restringen su consumo (24.5 kg/m²) que se encontraron con normopeso. El valor medio de toda la población a estudio se encontraba con ligero sobrepeso (26.2 kg/m²).

TABLA 1
Datos antropométricos de la población en función de la ingesta de calcio (X ± DS) (n=39)

	Calcio < 1200 mg/día n=25	Calcio > 1200 mg/día n=14	$\bar{X} \pm DS$ Población Total
Edad (años)	34.2 ± 5.4	34.4 ± 5.1	34.3 ± 5.2
Peso (kg)	73.3 ± 11.1*	66.3 ± 8.3	70.8 ± 10.7
Altura (cm)	164.7 ± 6.2	164.5 ± 4.1	164.6 ± 5.5
IMC (kg/m ²)	27.1 ± 4.2*	24.5 ± 3.0	26.2 ± 4.0

* p<0.05 Calcio < 1200 mg/día es estadísticamente significativo respecto a Calcio > 1200 mg/día.

En la Tabla 2 cabe destacar que el aporte energético medio de la toda población a estudio fue 2340.5 kcal, mientras que el grupo cuya ingesta era restrictiva consumía 2042.7 kcal, siendo esta cantidad significativamente inferior (p<0.01) respecto al grupo no restrictivo que ingería 2872.4 kcal, e insuficiente según las recomendaciones de energía establecidas por la NAS de Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) en 2730 kcal (11).

También se estudió el balance de las proporciones de macronutrientes para ambos grupos respecto a las IDR, mostrándose un ligero desajuste de dichos porcentajes en toda la población estudiada (Tabla 2).

Respecto a la ingestión de calcio y vitamina D, indicar que ambos nutrientes se encontraban por debajo de las recomendaciones, cuantificándose en un 64% del total de las mujeres que participaron en este estudio (Tabla 2).

TABLA 2
Datos nutricionales de la población a estudio en función de la ingesta de calcio y las ingestas aconsejadas/día (X ± DS)

	Calcio < 1200 mg/día n=25	Calcio >1200 mg/día n=14	Ingestas aconsejadas
Energía (kcal)	2042.7 ± 458.3**	2872.4 ± 849.0	IDR = 2730
Proteínas (% kcal)	16.0 ± 6.2 (81.3 ± 26.8 g)	17.4 ± 2.6 (124.1 ± 37.7 g)	IDR = 10-12 (65 g)
Lípidos (% kcal)	42.1 ± 7.9 (95.4 ± 18.5 g)	42.8 ± 5.44 (135.4 ± 17.4 g)	IDR < 35 (106 g)
Carbohidratos (% kcal)	41.9 ± 8.1 (161.6 ± 42.9 g)	39.8 ± 4.9 (289.1 ± 34.8 g)	IDR = 50-60 (341 g)
Calcio (mg)	812.4 ± 211.2**	1619.5 ± 250.7	IRP = 1200
Fósforo (mg)	1307.9 ± 290.1**	2154.4 ± 590.1	IA = 700
Calcio/Fósforo	0.62 ± 0.16**	0.78 ± 0.17	1 ó > 1
Vitamina D (µg)	1.71 ± 1.56*	3.15 ± 1.92	IA = 5
Hierro (mg)	11.9 ± 4.7**	21.0 ± 8.2	IA = 9

IDR: Ingestas Dietéticas de Referencia; IA: Ingestas adecuadas (11). IRP: Ingesta de Referencia para la Población (12).

* p<0.05 Calcio < 1200 mg/día es estadísticamente significativo respecto a Calcio > 1200 mg/día.

** p<0.01 Calcio < 1200 mg/día es estadísticamente significativo respecto a Calcio > 1200 mg/día.

[Haga clic aquí para ver la imagen ampliada](#)

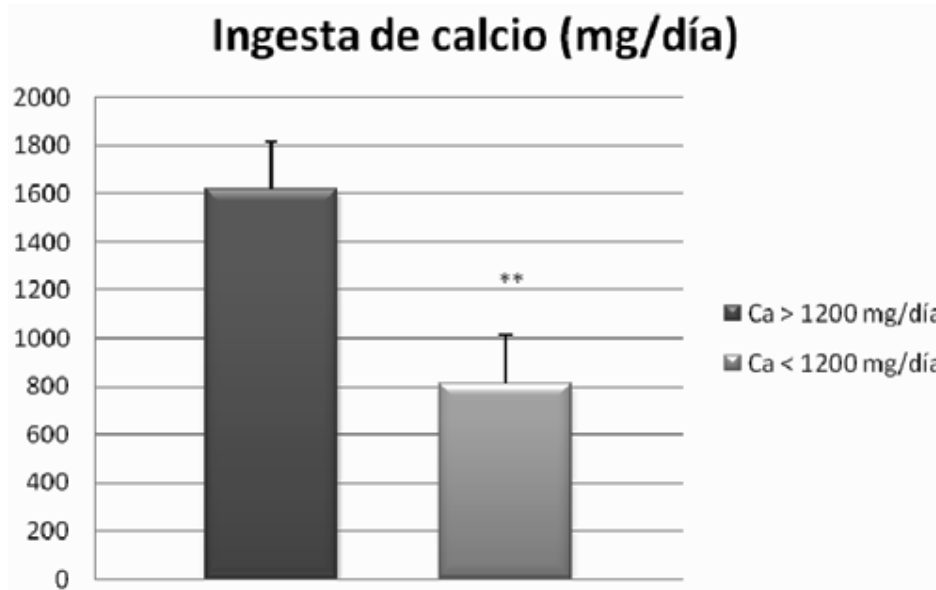
En el caso particular del fósforo y del hierro, sus valores en el consumo diario se encontraron por encima de las IA (700 mg/día y 9 mg/día respectivamente), siendo menor su consumo en aquellas madres con dieta restrictiva de calcio frente al resto, hallándose así una diferencia estadísticamente significativa (p<0.01) de un 40% y un 50% de la cantidad ingerida de fósforo y hierro respectivamente entre un grupo y otro.

En la Figura 1 se representan las diferencias estadísticamente significativas (p<0.01) de la ingesta de calcio entre el grupo de madres que restringían su consumo (812.4 ± 211.2 mg/día) frente a las que no lo hacían (1619.5 ± 250.7 mg/día), observándose una variación del 50% de la cantidad de calcio ingerido en el grupo de las restrictivas.

Asimismo, en la Figura 2 se muestran las variaciones en el consumo de vitamina D de un grupo frente a otro, existiendo también una diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) de la cantidad consumida de esta vitamina en el grupo que restringe la ingesta de calcio (1.71 ± 1.56µg) frente al que no la restringe (3.15 ± 1.92µg), siendo esta variación del 50%, igual que la que se pudo mostrar en la figura anterior para la ingesta de calcio.

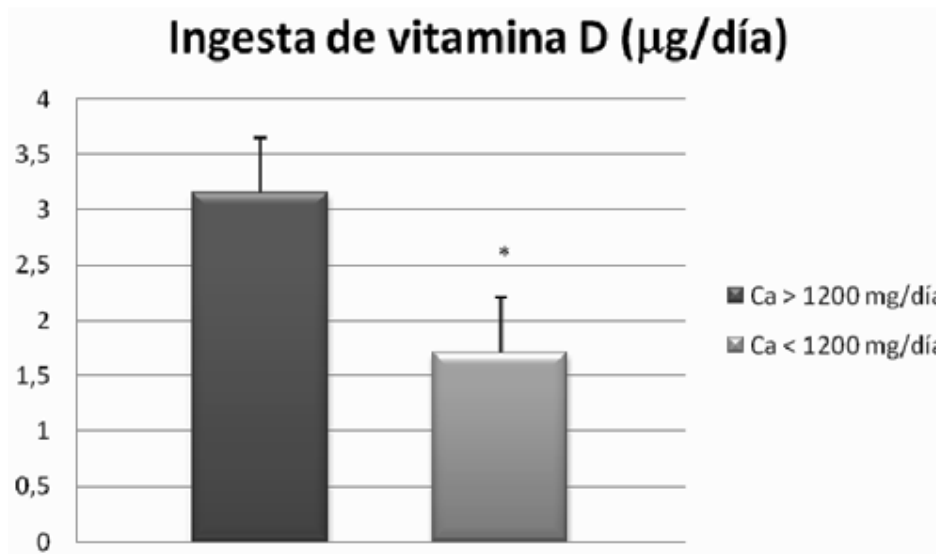
Respecto al coeficiente de relación calcio/fósforo, se observó que el cociente no era igual a 1, tal y como se recomienda, siendo mayor y más cercano a la unidad (0.78 ± 0.17) en el grupo de madres no restrictivas frente al grupo de madres con dieta restrictiva para el calcio (0.62 ± 0.16), encontrándose así diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) de esta relación calcio/fósforo entre un grupo y otro. Para el test de correlación lineal de ambos micronutrientes en toda la población, se obtuvo una correlación positiva ($R = 0.78$; $p < 0.01$), tal y como se recoge en la Figura 3 con su correspondiente función lineal ($y = 1.0149x + 488.63$).

TABLA 1
Datos antropométricos de la población en función de la ingesta de calcio ($X \pm DS$)
(n=39)



* $p < 0.05$ Calcio < 1200 mg/día es estadísticamente significativo respecto a Calcio > 1200 mg/día.

FIGURA 2
Comparativa de la ingesta de vitamina D en madres con lactancia exclusiva en función del consumo de calcio (n=39)



* $p < 0.05$ Calcio < 1200 mg/día es estadísticamente significativo respecto a Calcio > 1200 mg/día.

Tras el análisis de todas las dietas, esta deficiencia en el aporte diario del mineral calcio quedó reflejada también en el bajo porcentaje de alimentos ricos en calcio consumidos diariamente, como la leche o los derivados lácteos.

Asimismo, en la Figura 4 se representa el nº de raciones/madre de los 4 grupos de leche y derivados lácteos (yogures, queso fresco y queso curado) en función de la ingesta de calcio. De todas las madres encuestadas, tan solo un 59% ingirieron más de una ración diaria de leche (datos no mostrados). Puede observarse la variación en las raciones de leche en el grupo que no restringe su ingesta de calcio frente al que sí lo hace, con una diferencia en dicho aporte diario de leche de un 40%. Dicha tendencia en el consumo de leche en el grupo restrictivo también se repite en el número de raciones con el resto de derivados lácteos.

FIGURA 3
Representación de las ingestas diarias de calcio y fósforo en toda la población estudiada; $R = 0.78$ y $p < 0.01$

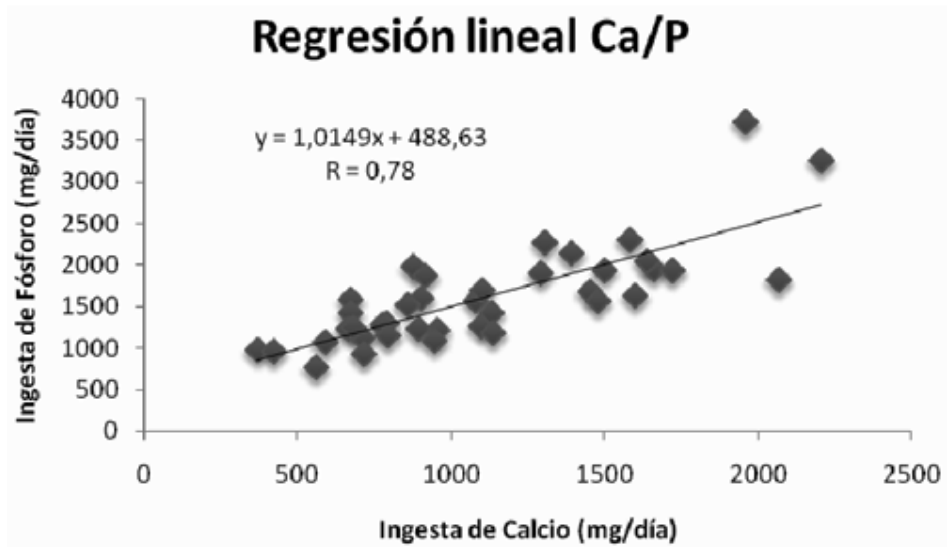
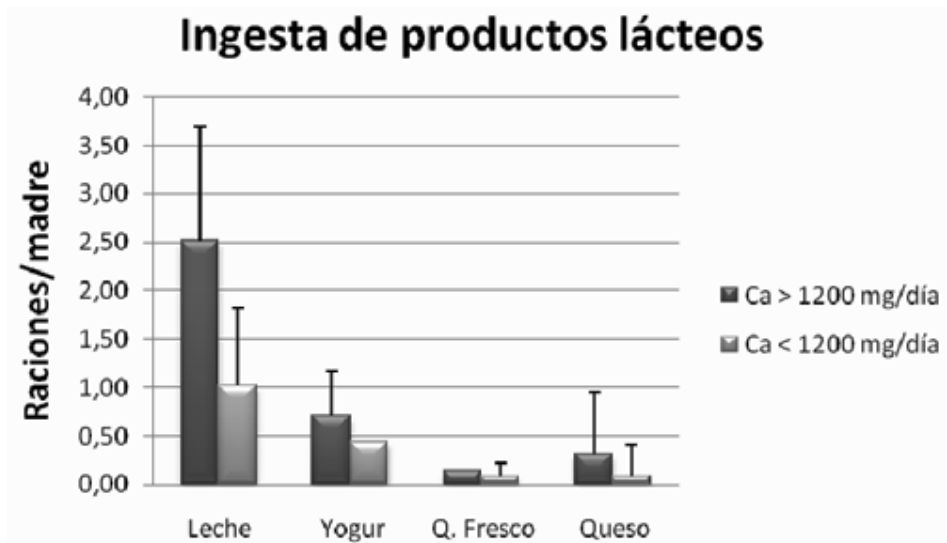


FIGURA 4
Comparativa de la ingesta de raciones de leche y derivados lácteos en madres con lactancia exclusiva en función del consumo de calcio (n=39)



DISCUSION

La ingesta de calcio difiere con la edad y el grupo poblacional, siendo el requerimiento más elevado durante las etapas de gestación y lactancia debido a la demanda anabólica a la que están sometidas las mujeres en estos dos períodos.

Numerosas encuestas a la población española sugieren que al menos un 90% de las personas encuestadas toman leche diariamente. Esto se corrobora con la hipótesis del presente trabajo, no obstante, las cantidades de calcio consumidas en el grupo de madres que restringen su ingesta (sea por cuestiones culturales u otras) son muy inferiores a las recomendadas (11,12) tal y como ya se mostraron otros estudios anteriores (8-10, 25,26).

Es conocido que en aquellos lactantes cuyas madres restringen la ingesta de calcio, aparezcan efectos negativos sobre dicho bebé, tales como la pérdida de peso, aumento del llanto, descenso de la calma, así como un aumento del cólico en el lactante (27,28).

La energía media obtenida de toda la población estudiada se encuentra por debajo de los niveles recomendados (29), sobre todo en aquellas madres que poseen una dieta restrictiva, las cuales presentan un aporte energético muy deficiente. Muchas de las que restringen su aporte energético -y a la vez el del calcio- lo hacen por falsos prejuicios dietéticos, relacionados éstos con la pérdida de grasas tras el parto para una rápida disminución de su peso. Sin embargo, numerosos estudios sugieren la posibilidad de reducir las grasas y el peso corporal en mujeres obesas a través de una dieta rica en calcio (30-33). Esto se debería a que el calcio inhibe en el adipocito la lipogénesis. Así, tal y como se observa en los resultados presentes, aquellas madres que restringen el consumo de calcio, son las que padecen más sobrepeso respecto a las que no restringen este mineral ($p < 0.01$).

Al igual que se obtuvo en un estudio nutricional en mujeres italianas en lactancia (34), en esta investigación también se ha encontrado un ligero desajuste del balance energético. Sería recomendable por tanto, reducir la ingesta de grasas e incrementar el consumo de carbohidratos lo justo y necesario para alcanzar el 55% de la energía obtenida con la alimentación diaria.

Tal y como se ha encontrado en otras referencias bibliográficas respecto a la ingesta de calcio, se puede indicar que existe un gran descenso de este mineral en las madres restrictivas frente a las que no restringían su ingesta, siendo estos valores muy similares a los obtenidos por otros autores (8-10,12,35), lo cual sería un factor de riesgo para la osteoporosis si dicho déficit de calcio se mantiene a lo largo de las tres primeras décadas de vida. Además, si el descenso de este mineral se produce a lo largo del periodo de lactancia, los niveles de calcio en su leche madura se van encontrar disminuidos, con el consiguiente perjuicio al lactante (8).

Hay varios alimentos con un gran aporte en calcio, sin embargo, este mineral se encuentra en mayor proporción y biodisponibilidad en la leche y los derivados lácteos. Son muchos los beneficios aportados con estos alimentos, asimismo un vaso de leche al día aporta 8 g de proteína, 0.98 mg de zinc y 308 mg de calcio, el cual ve fortalecida su absorción con 2.56 μ g de vitamina D. La restricción de leche por tanto, impide el acceso a una fuente muy importante de vitamina D, no obstante, debido a la latitud a la cual se encontraba la población del presente estudio (Extremadura, España), esto es, próxima al Ecuador, se podría llegar a alcanzar una adecuada biosíntesis de esta vitamina mediante exposición solar, no siendo necesaria su suplementación en la dieta (35), aunque otros estudios con una población similar a la estudiada (mediterránea), recomiendan su suplementación alimentaria (21).

Incidir sobre el grupo de mujeres que no mantuvieron restricción en la ingesta de calcio, las cuales además de un correcto aporte en leche y derivados lácteos, también ingirieron (gracias a su dieta más equilibrada) otros alimentos ricos en calcio, como son el grupo de legumbres (judías, garbanzos y lentejas) y el grupo de pescados.

La importancia de la relación calcio/fósforo radica en las carencias óseas que se podrían sufrir si este cociente no se encuentra cercano a 1 o incluso superior. Es decir, se trataría de prevenir futuros procesos de osteoporosis y posibles fracturas de cadera en la madre, ya que se ha descrito que una ingesta elevada de fósforo favorecería el desarrollo de esta enfermedad, sobre todo cuando la ingesta de calcio es baja (18). Con los resultados obtenidos de correlación lineal de ambos micronutrientes se puede deducir que aunque se aumenten o excedan los niveles de ingesta en calcio, nunca van a superar a los de fósforo para llegar a la relación calcio/fósforo mayor o igual a 1, lo cual debería ser corregido intentando disminuir el consumo de alimentos ricos en fósforo como son los cereales y sus derivados, además de embutidos y huevos, ya que un exceso de fósforo en la dieta perjudica la absorción y metabolismo del calcio (8, 18).

CONCLUSIONES

Como conclusión final cabe señalar que el 64% del total de mujeres con lactancia exclusiva de la población a estudio, posee una dieta deficiente en energía, mineral calcio y vitamina D. Sólo el 36% de las madres participantes tuvo un adecuado consumo de estos nutrientes, las cuales además constataban normopeso, pudiendo relacionar dicha cualidad antropométrica a un consumo adecuado de calcio.

Con este estudio se espera alertar a los profesionales sanitarios para que asesoren a este colectivo de mujeres de la enorme importancia que tiene durante esta época de la vida ingerir un aporte equilibrado, tanto de macros como micronutrientes y de forma especial de calcio, con el fin de generar leche materna de alta calidad y prevenir futuras patologías como la pérdida de densidad ósea (8).

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer su colaboración a todo el personal de la Unidad de Neonatología del Hospital Materno Infantil de Badajoz, así como a D^a Elena Circujano, técnico de nuestro laboratorio.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. Energy and Protein Requirement Technical Report Series nº. 724. p 20. Geneva: WHO. 1985.
2. Comité de lactancia materna de la AEP. Monografía de la AEP nº 5. 1ª ed. Madrid: Ergon; 2004.
3. Rivero M. La alimentación de tu hijo los primeros meses de vida. 1996. Alimentación de la embarazada "Vida Clandestina" edit. A. Delgado. Capit. 12, p. 192-203. Ediciones Mensuales.
4. Hartmann P, Sherrif J, Kent K. Maternal nutrition and the regulation of milk synthesis. Proc Nutr Soc. 1995; 54:379-389.
5. Emmett PM, Rogers LS. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. Early Hum Dev. 1997; 49:7-28.
6. Mackey AD, Picciano MF, Mitchell DC, Smiciklas-Wright H. Self-selected diets of lactating woman often fail to meet dietary recommendations. J Am Diet Assoc. 1998; 98:287-302.
7. Thomas M, Weisman SM. Calcium supplementation during pregnancy and lactation: effects on the mother and the fetus. Am J Obstet Gynecol. 2006; 194:937-945.
8. Ortega RM, Martínez RM, Quintas ME, López-Sobaler AM, Andrés P. Calcium levels in maternal milk: relationships with calcium intake during the third trimester of pregnancy. Br J Nutr. 1998; 79:501-507.
9. Mannion CA, Gray-Donald K, Koski KG. Association of low intake of milk and vitamin D during pregnancy with decreased birth weight. CMAJ. 2006; 179:1273-1277.
10. Mannion CA, Gray-Donald K, Johnson-Down L, Koski KG. Lactating women restricting milk are low on select nutrients. J Am Coll Nutr. 2007; 26:149-155.
11. Dietary References Intakes (DRI) for Calcium, Phosphorus, Magnesium, vitamin D and Fluoride. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary References Intakes, Food and Nutrition Board & Institute of Medicine. Washington DC; National Academy of Sciences, 1997.
12. Nutrient and energy intakes of the European Community. Reports of Scientific Committee for Food, Thirty-first series. Luxemburg; Commission of the European Communities, 1993.
13. Pita Martín de Portela ML. Necesidades de calcio y recomendaciones de ingesta. Actualiz Osteología. 1998; 3:66-75.
14. Krebs NF, Reidinger CJ, Robertson AD, Brenner M. Bone mineral density changes during lactation: maternal, dietary and biochemical correlates. Am J Clin Nutr 1997; 65:1738-1746.
15. Thomas M, Weisman SM. Calcium supplementation during pregnancy and lactation: effects on the mother and fetus. Am J Obstet Gynecol. 2006; 194:937-945.
16. Basile L, Taylor S, Wagner C, Horst R, Hollins B. The effect of high-dose vitamin D levels and milk calcium concentration in lactating women and their infants. Breastfeed Med. 2006; 1:27-35.
17. Ettinger AS, Tellez-Rojo MM, Amarasiwardena C, Peterson Ke, Schwartz J, Aro A, et al. Influence of maternal bone lead and calcium intake on levels of lead in breast milk over the course of lactation. Am J Epidemiol. 2006; 163:48-56.
18. Hollis BW, Wagner CL. Assessment of dietary vitamin D requirements during pregnancy and lactation. 2004; Am J Clin Nutr. 79:717-726.
19. Hollis BW, Wagner CL. Vitamin D requirements during lactation: high dose maternal supplementation as prevent hypovitaminosis D for both, the mother and the nursing infant. 2004; Am J Clin Nutr. 80:157-178.
20. Wagner CL, Husley TC, Fanning D, Ebeling M, Hollis Bw. High-dose vitamin D3 supplementation in a cohort of breastfeeding mothers and their infants: a 6-month follow-up pilot study. 2006; Breastfeed Med. 1:57-58.
21. Nicolaidou P, Hatzistamatiou Z, Papadopoulou A, Kaleyias J, Floropoulou E, Lagona E, et al. Low vitamin D status in mother-newborn pairs in Greece. 2006; Calcif Tissue Int. 78:337-342.

22. Kovacs CS. Vitamin D in pregnancy and lactation: maternal, fetal, and neonatal outcomes from human animal studies. 2008; *Am J Clin Nutr.* 2:520-528.
23. Mataix JM, Mañas M. Tablas de composición de alimentos españoles. 3ª ed. Granada: Monográfica; 1998.
24. Requejo AM, Ortega RM. El rombo de la alimentación. Ministerio de Sanidad y Consumo. Secretaría General Técnica. Madrid; 1996.
25. Basabe B, Mena MC, Faci M, Aparicio A, López AM, Ortega RM. Influencia de la ingesta de calcio y fósforo sobre la densidad mineral ósea en mujeres jóvenes. *Arch Latinoam Nutr.* 2004; 54(2).
26. Doran L, Evers S. Energy and nutrient inadequacies in the diets of low-income women who breast-fed. *J Am Diet Assoc.* 1997; 97:1283-1287.
27. Garrison MM, Christakis DA. A systematic review of treatments for infant colic. *Pediatrics.* 2000; 106:184-190.
28. Hill DJ, Hosking CS. Infantile colic and food hypersensitivity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; 30:67-76.
29. Thompson OC, Gil A. Requerimientos nutricionales durante la gestación y la lactancia. In: Gil A, editor. *Tratado de nutrición.* 1ª ed. Madrid: Acción Médica; 2005. p. 192-216.
30. Zemel M, Teegarden D. Regulation of adiposity and obesity risk by dietary calcium: mechanisms and implications. *J Am Coll Nutr.* 2002; 21:146-151.
31. Zemel MB, Thompson W, Milstead A, Morris K, Campbell P. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obes Res.* 2004; 12:582-590.
32. Melanson EL, Donahoo WT, Dong F, Ida T, Zemel MB. Effect of low- and high-calcium dairy-based diets on macronutrient oxidation in humans. *Obes Res.* 2005; 13:2102-2112.
33. Teegarden D, White KM, Lyle RM, Zemel MB, Van Loan MD, Matkovic V et al. Calcium and dairy product modulation of lipid utilization and energy expenditure. *Obesity (Silver Spring).* 2008; 16:1566-1572.
34. Giammarioli S, Sanzini E, Ambruzzi AM, Chiarotti F, Fasano G. Nutrient intake of Italian women during lactation. *Int Vitam Nutr Res.* 2002; 72(5).
35. Cashman KD. Calcium and vitamin D. *Novartis Found Symp.* 2007; 282:123-138.

ORIGINAL ARTICLE

A new analytical technique in capillary electrophoresis: studying the levels of nucleotides in human breastmilk

Javier Cubero¹, Javier Sanchez², Cristina Sanchez¹, David Narciso¹, Carmen Barriga¹, Ana Beatriz Rodríguez¹

¹Department of Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, Badajoz, Spain

²Laboratory of Metabolism, Hospital “Perpetuo Socorro”, Badajoz, Spain

Received 12th March 2007.

Revised 23th April 2007.

Published online 11th May 2007.

Summary

The effect of nucleotides in the newborn is a determinant in this first stage of life, and their correct level in breastmilk is vital. We have designed a new method for the assay of nucleotides in milk by capillary electrophoresis (CE) after acid hydrolysis. Breastmilk samples were collected from healthy mothers (ages, 25–35 years) of one month lactation, and stored at -20 °C. The duplicated samples were dissociated by acidic hydrolysis (HClO₄) and the CE assay was performed in an uncoated fused-silica capillary using an alkaline (borate) electrophoretic separation system.

The method gave good recoveries of 5'-mononucleotides. Under the conditions used, the actual CE analysis time was less than 20 minutes. The physiologically and nutritionally important nucleotides were detected at concentrations of 387 µg/100ml for UMP-5P, 385.3 µg/100ml for AMP-5P, 67 µg/100ml for CMP-5P, 172 µg/100ml for TMP-5P and 315 µg/100ml for GMP-5P. Nucleotides are a significant nutrient in infant growth, and capillary electrophoresis is a sensitive and efficient tool for the assay of nucleotides with a purine or pyrimidine base in breastmilk.

Keywords: nucleotides – capillary electrophoresis – breastmilk

INTRODUCTION

Mother's milk is the best food for infants, and so knowledge of its composition would contribute to the understanding of infant nutrition. Approximately 15–25% of the total nitrogen

content of human milk is in non-protein compounds, including the nucleotides (Atkinson et al. 1980).

Nucleotides are the primary units of the nucleic acids (RNA, DNA) which control the reproduction, growth, and metabolism of living systems. They consist of a cyclic nitrogen-containing base (purine or pyrimidine), a sugar (pentose), and one or more phosphate groups. There has been increasing interest in the nutritional aspect of dietary nucleotides. They may play an important role in human physiology, especially in infants. Dietary nucleotides seem to influence several aspects of neonatal development, such as modulating lipoprotein metabolism, modifying the composition of the gut's microflora, and

✉ Javier Cubero Juárez, Department of Physiology, Faculty of Sciences, Extremadura University, Avenida de Elvas s/n, 06071 - Badajoz, Spain

✉ jcubero@unex.es

☎ +34 924289388

☎ +34 924289388

participating in the immune response mediated by T-cells and sleep (Gil and Sanchez-Medina 1981, Barnes 1994, Carver 1994, Uauy and Gil 1994, Gil and Uauy 1995, Leach et al. 1995, Schlimme et al. 1997, Boza et al. 1998). Moreover, rapidly growing tissues such as the intestinal epithelium and lymphoid cells lack any significant capacity for *de novo* synthesis of nucleotides and require exogenous sources of the compounds (Oliveira et

al. 1999). Neither should one forget the influence that uridine and adenosine have on the regulation of formula-fed infants' sleep (Cubero et al. 2006), as well as the hormonal regulation that they exert through their ingestion in milk in the first stages of life (Vasques-Garibay et al. 2006), in particular the regulation of insulin-like growth factors such as IGF-I and IGFBP-3.

Table 1. Values found in the literature on the analysis of nucleotides in milk

Nucleotides	Authors	Samples	Analysis	Concentration
5'-UMP	Janas and Picciano 1982	Breastmilk	HPLC	321 µg/100ml
	Sugawara et al. 1995	Breastmilk	HPLC	0.23 µmol/100ml
	Perrin et al. 2001	Starter formula	HPLC	63 mg/kg
5'-AMP	Janas and Picciano 1982	Breastmilk	HPLC	143 µg/100ml
	Sugawara et al. 1995	Breastmilk	HPLC	0.23 µmol/100ml
	Perrin et al. 2001	Starter formula	HPLC	21 mg/kg
5'-GMP	Janas and Picciano 1982	Breastmilk	HPLC	163 µg/100ml
	Sugawara et al. 1995	Breastmilk	HPLC	n.d
	Perrin et al. 2001	Starter formula	HPLC	11 mg/kg
5'-CMP	Janas and Picciano 1982	Breastmilk	HPLC	321 µg/100ml
	Sugawara et al. 1995	Breastmilk	HPLC	4.29 µmol/100ml
	Perrin et al. 2001	Starter formula	HPLC	108 mg/kg
5'-IMP	Janas and Picciano 1982	Breastmilk	HPLC	290 µg/100ml
	Sugawara et al. 1995	Breastmilk	HPLC	n.d.

Uridine 5' monophosphate (5'-UMP); adenosine 5' monophosphate (5'-AMP); guanosine 5' monophosphate (5'-GMP); cytidine 5' monophosphate (5'-CMP); inosine 5' monophosphate (5'-IMP).

The nucleotide levels in milk have been analyzed by different authors principally using HPLC as the analytical technique. Janas and Picciano (1982) initiated the use of this technique for the analysis of nucleotides in human milk, for which Sugarawa et al. (1995) later quantified three nucleosides and six nucleotides. Finally, Perrin et al. (2001) quantified 5 nucleotides and 5 nucleosides in formula milk. These results are summarized in Table 1.

The last ten years have seen the development of the very effective technique of capillary electrophoresis (CE) for nucleotide assay (Uhrova et al. 1996, Adam et al. 1999, Hornik et al. 2007),

although not specifically for human milk. The purpose of the present work was therefore to develop a reliable and fast method of nucleotide assay in human milk using acid hydrolysis and quantification by CE.

MATERIALS AND METHODS

Equipment

The CE system used is a P/ACE MDQ Systems 5510 equipped with a diode array detector (Beckman Coulter, Inc., USA). The system can be

rapidly reconfigured from a flexible research platform to a tightly regulated routine use platform. Automated fractionation of a detected peak allows isolation of newly resolved compounds for external identification.

Capillary cartridges

The capillaries are housed in user-assembled cartridges which are compatible with all current CE capillaries. For the present study of nucleotides, the CE separations were carried out in an uncoated-silica capillary (75 μm i.d. \times 375 μm o.d.; Polymicro Technologies, LLC, USA) with an effective length of 20 cm.

Detector modules

To allow for flexible method development and rugged routine use, the P/ACE MDQ's design makes it easy to interchange high-sensitivity diode array (DAD), UV/Vis, and laser-induced fluorescence (LIF) detection modules. An external detector adapter allows the capillary to be extended to additional detection systems.

Software for the CE analysis

The 32 KaratTM software package specific to capillary electrophoresis includes mobility plot generation, advanced reports, and new 2D algorithms to couple mobility and spectral signatures for peak identification. All of this results in a fully integrated CE control and data analysis workstation.

The methods are defined and edited in table format. All functions for the system are handled in a single window, including programming of the buffer array for the automation of strategies for the development of methods, using filters such as scan range, wavelength maximum, and mobility.

Control and analysis

Peak identification using either time or mobility, coupled with spectral signature confirmation, creates powerful 2D peak identification schemes. Velocity-Calibrated Peak Area and CAESAR integration ensure reproducible quantification at low limits of detection.

Reagents

Adenosine 5' monophosphate, uridine 5' monophosphate, guanosine 5' monophosphate, thymidine 5' monophosphate, cytidine 5' monophosphate, boric acid, and sodium dodecylsulfate were purchased from Sigma-Aldrich, USA. All other chemicals were of analytical purity grade. Perchloric acid 60%, sodium hydroxide pellet and potassium hydroxide 85% pellets were purchased from Panreac, Spain.

All solutions were prepared using de-ionized water (*Milli-Q System*).

Procedure

Preparation of stock solutions

The values reported in the literature indicated that the nucleotide concentrations in human milk would be in the range 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Stock nucleotide solutions were therefore prepared in the following concentrations: 10×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1×10^{-3} , and 0.5×10^{-3} mg/ml of adenosine 5-P, cytidine 5-P, guanosine 5-P, thymidine 5-P, and uridine 5-P.

Extraction of nucleotides for breastmilk

We followed the technique of Perrin et al. (2001) with certain modifications. We started from milk samples of healthy women of at least 4 weeks lactation. Aliquots of 0.75 ml of each sample were hydrolysed with 0.75 ml of 13% perchloric acid, mixing for 45 min on a roller mixer. After centrifuging at 5000 g for 20 min at room temperature, the supernatant was collected, discarding the fatty halo.

The solution was then adjusted to neutral pH with 5M KOH, and left in an ice bath for 1 h for all the potassium perchlorate to precipitate. It was then filtered through a 0.45 μm membrane filter (*Milllex*, Millipore, USA) before assay.

CE analysis

All experiments were performed on a P/ACE System 5510 (Beckman Coulter, Inc., USA). The CE separations were carried out in an uncoated-silica capillary (50 μm i.d. \times 375 μm o.d.; Polymicro Technologies, LLC, USA) with an effective length of 20 cm. Detection was by ultraviolet over the range 190-300 nm (cartridge detection window 100 \times 800 μm).

Samples were loaded by low-pressure injection (3.45 KPa) for 6 s (14.3 nl, 2.7% of the total capillary volume injected). Borate buffers were prepared from boric acid, sodium dodecyl sulfate (SDS) was added, and the solution was adjusted with 500 g/l NaOH to the appropriate pH. The capillary was washed at the beginning of each working day with de-ionized water, 0.1M sodium hydroxide, water, and finally with a separation buffer for 5 min.

Between runs, it was rinsed with water for 1 min and with a separation buffer for 2 min. The assays were run at constant voltage using a ramp of 1 min.

The alkaline (borate) separation system as described by Adam et al. (1999) was used as follows. The capillary was operated at 30 °C. The separation buffer was prepared from boric acid (60 mmol/l), sodium dodecylsulfate (80 mmol/l), and adjusted with 2-amino-2-methyl-1-propanol to neutral pH. Assays were run at +10 kV (positive outlet).

The detector's data rate was set at 4 Hz.

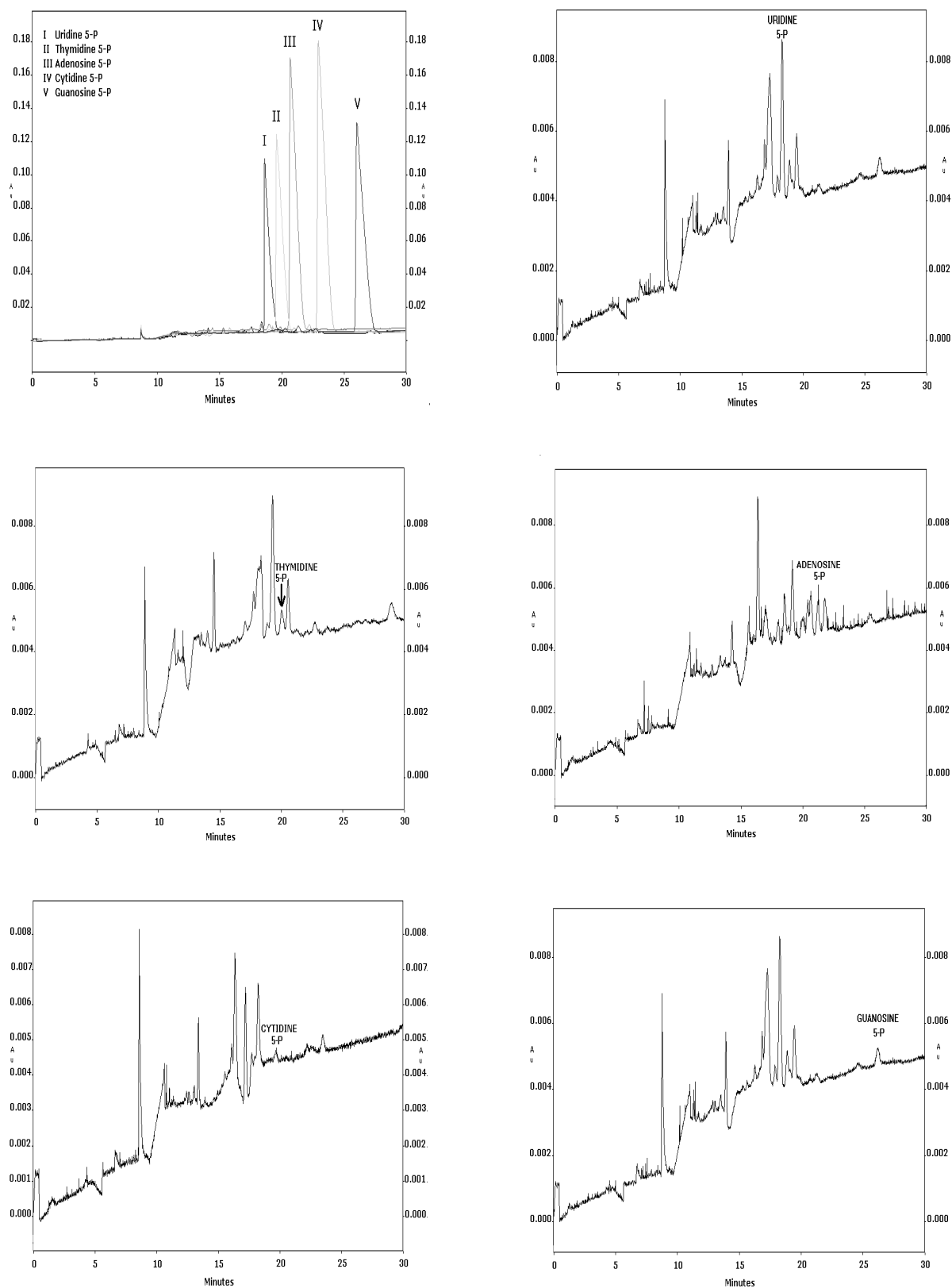


Fig. 1. Typical electropherograms of the standard nucleotides and samples. Capillary temperature, 30 °C; voltage, 10 kV; detection wavelength, 200 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Twenty human milk samples from lactating women were analyzed by this method. Each sample presented different dominant peaks.

The system provides electropherograms at 200 nm (the optimal wavelength for these samples) such as the example shown in Fig. 1. All five nucleotides were detectable at both the lowest and the greatest concentrations tested with the alkaline system used. At pH>9, however, the run-to-run reproducibility was lower (data not shown). Interday variation was less than 9.5%.

The stability of these nucleotides was tested in water at -20 °C, 4 °C, and room temperature. They were all stable at -20 °C (half-life 12 months).

The results of the breastmilk assays were as follows (see Fig. 2): 387 µg/100ml for UMP-5P; 385.3 µg/100ml for AMP-5P; 67 µg/100ml for CMP-5P; 315 µg/100ml for GMP-5P; and 172 µg/100ml for TMP-5P. These mean values are significantly greater than the literature values quantified by HPLC by Janas and Picciano (1982) and Sugarawa et al. (1995), presumably reflecting

the greater sensitivity of the capillary electrophoresis technique for the assay of nucleotides in human milk.

CONCLUSION

A simple and effective analytical method has been developed for the routine electrophoretic determination of nucleotides in breastmilk in an uncoated fused-silica capillary. It benefits from the important advantages of capillary electrophoresis such as the small demand on sample size, simplicity of operation, low solvent consumption, and short analysis time.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude to Laboratories Ordesa S.L., Servicio Extremeño de Salud (S.E.S), Spain and Elena Circujano, the laboratory technician of the Physiology Laboratory for her technical assistance.

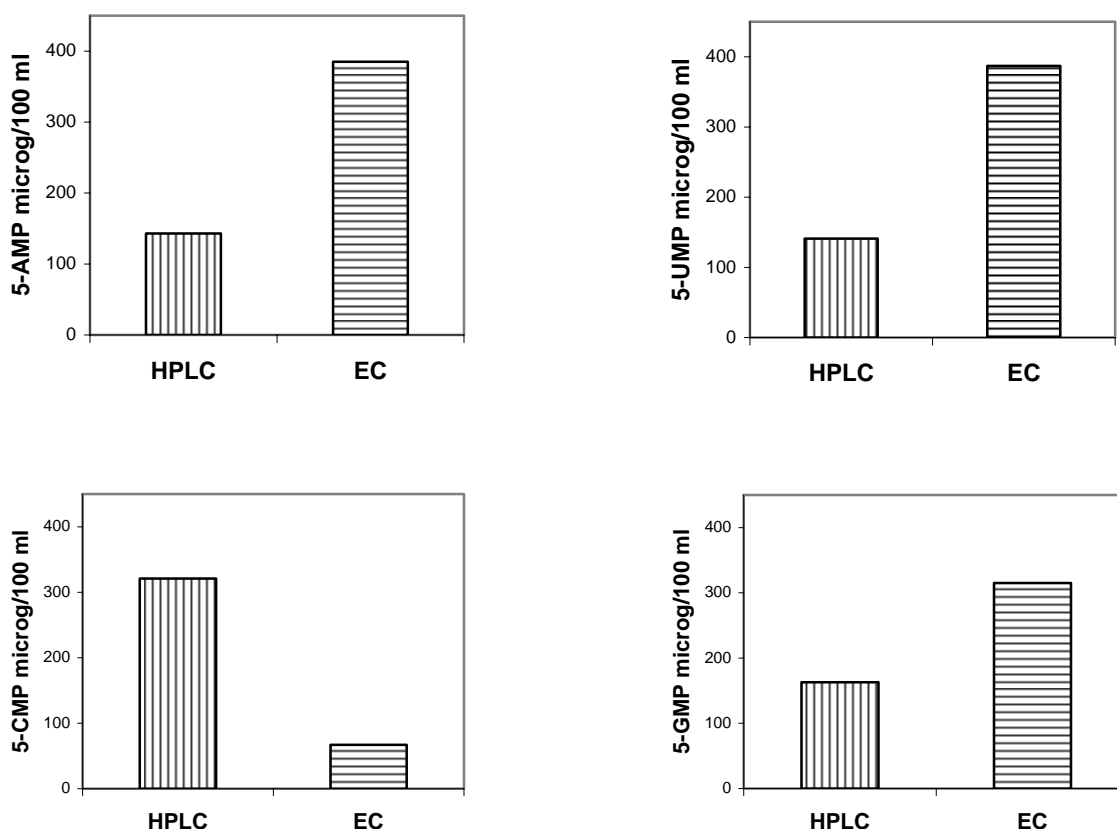


Fig. 2. Nucleotide levels in breastmilk (Arithmetic mean; X) quantified by capillary electrophoresis (CE), and their comparison with the literature levels determined by HPLC (Janas and Picciano 1982).

REFERENCES

- Adam T, Friedecký D, Fairbanks LD, Ševčík J, Barták P: Capillary electrophoresis for detection of inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Clin. Chem.* 45:2086–2093, 1999.
- Atkinson SA, Anderson GH, Bryan MH: Human milk: comparison of the nitrogen composition in milk from mothers of premature and full-term infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 33:811, 1980.
- Barnes LA: Dietary sources of nucleotides from breast milk to weaning. *J. Nutr.* 124:128–130, 1994.
- Boza J: Nucleotides in infant nutrition. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 146 (Suppl.):39–48, 2007.
- Carver D: Dietary nucleotides: cellular immune, intestinal and hepatic system effects. *J. Nutr.* 124:144–148, 1994.
- Cubero J, Narciso S, Aparicio S, Garau C, Rial R, Rivero M, Rodríguez AB, Barriga C: Improved circadian sleep-wake cycle in infants fed a day/night dissociated formula milk. *Neuro Endocrinol. Lett.* 27:373–380, 2006.
- Gil A, Sanchez Medina F: Acid-soluble nucleotides of cow's, goat's and sheep's milks, at different stages of lactation. *J. Dairy Res.* 48:35–44, 1981.
- Gil A, Uauy R: Nitrogenous component of milk. Nucleotides and related compounds in human and bovine milks. In Jensen RG (ed.): *Handbook of Milk Composition*. Academic Press, London 1995, pp. 436–464.
- Hornik P, Vyskočilová P, Friedecký D, Janošťáková A, Adamová K, Adam T: Analysis of aminoimidazole ribosides by capillary electrophoresis. Diagnosing defects in second part of purine biosynthetic pathway. *Clin. Chim. Acta* 376:154–189, 2007.
- Janas LM, Picciano M: The nucleotide profile of human milk. *Pediatr. Res.* 16:659–662, 1982.
- Leach JL, Baxter JH, Molitor BE, Ramstack MB, Masor ML: Total potentially available nucleosides of human milk by stage of lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* 61:1224–1230, 1995.
- Oliveira C, Ferreira IM, Mendes E, Ferreira M: Development and application of HPLC/diode array methodology in the determination of nucleotides in infant formulae and follow-up milks. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22:571–578, 1999.
- Perrin C, Meyer L, Mujahid C, Blake C: The analysis of 5'-mononucleotides in infant formulae by HPLC. *Food Chem.* 74:245–253, 2001.
- Schlimme E, Martin D, Meisel H, Schneehagen K, Hoffmann S, Sievers E, Ott FG, Raetzke KP: Species-specific composition pattern of milk ribonucleosides and nucleotides of human milk: chemical and physiological aspects. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 49:305–326, 1997.
- Sugarawa M, Sato N, Nakato T, Idota T, Nakajima I: Profile of nucleotides and nucleosides of human milk. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 41:409–418, 1995.
- Uauy R, Quan R, Gil A: Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. *J. Nutr.* 124:1436–1441, 1994.
- Uhrová M, Deyl Z, Suchánek M: Separation of common nucleotides, mono-, di-, and triphosphate, by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr B, Biomed. Appl.* 681:99–105, 1996.
- Vasquez-Garibay E, Stein K, Kratzsch J, Romero-Velarde E, Jahreis G: Effect of nucleotides intake and nutritional recovery on insulin-like growth factor I and the other hormonal biomarkers in severely malnourished children. *Br. J. Nutr.* 96:683–690, 2006.

The possible role of human milk nucleotides as sleep inducers

**Cristina L. Sánchez¹, Javier Cubero¹, Javier Sánchez², Belén Chanclón¹,
Montserrat Rivero³, Ana B. Rodríguez¹, Carmen Barriga¹**

¹*Department of Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura. Badajoz, Spain*

²*Laboratory of Metabolism, Hospital 'Perpetuo Socorro', Badajoz, Spain*

³*Ordesa Group, St Boi de Llobregat, Barcelona, Spain*

Breast-milk contains a potent mixture of diverse components, such as the non-protein nitrogen fraction which includes nucleotides, whose variation in levels is evident throughout lactation. In addition, these substances play an important role in sleep homeostasis. In the present study, human milk samples were analyzed using a capillary electrophoresis system. The rhythmicity of each nucleotide was studied by cosinor analysis. It was found that the nucleotides 5'AMP, 5'GMP, 5'CMP, and 5'IMP have significant ($P < 0.05$) circadian rhythms, the acrophases of the first two being during the night, and of the latter two during the day. While 5'UMP did not show a clear circadian rhythm, there was an increase in its levels at night. In conclusion, the rise in nocturnal levels of 5'AMP, 5'GMP, and 5'UMP could be involved in inducing the 'hypnotic' action of breast-milk at night in the infant.

Keywords: nucleotides, circadian, sleep, human milk, capillary electrophoresis

Introduction

A joint declaration by the World Health Organization (WHO) and the United Nations Children's Fund (UNICEF) stated that breast-milk is the optimal food for infants and can never be equalled by artificial substitutes. It covers all the child's physiological and nutritional needs during the first 4–6 months of life.¹ For this reason, there is growing interest in attempting to make infant formulas that more closely resemble mother's milk. Infant formulas are the only processed food products that fully meet the nutritional needs of infants during the first months of life until the introduction of adequate supplementary feeding.²

The milk of every mammalian species has a different composition, tailored to the digestive, nutritional, and growth needs of its offspring. Human milk is a living fluid that changes with time, with its composition and volume being modified both during the course of each day and throughout the breast-feeding period. Its non-protein nitrogen fraction includes nucleotides whose concentrations are known to vary throughout lactation. In particular, there is an increase in nucleotide concentration in the mature milk (from day 15 postpartum) relative to the colostrum (4–5 days' postpartum).³

Nucleotides are the building blocks of nucleic acids responsible for storing and transmitting genetic information. They are precursors of energy-rich compounds that control the metabolic processes (biosynthesis, fundamentally) in all cells. Their skeleton consists of a pentose (carbohydrate), a nitrogen-containing base, and a phosphate group. The commonest are nucleotides where the nitrogen-containing base is a purine – adenosine

Correspondence to: Cristina L. Sánchez López, Department of Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, Av. Elvas s/n, 06071 Badajoz, Spain. Tel: +34 (0)924 289388; Fax: +34 (0)924 289388; E-mail: crissanchez@unex.es
Received 25 March 2008, revised manuscript accepted 19 August 2008

5'monophosphate (5'AMP), guanosine 5'monophosphate (5'GMP), and their precursor, inosine 5'monophosphate (5'IMP) – or a pyrimidine – uridine 5'monophosphate (5'UMP), cytidine 5'monophosphate (5'CMP), and thymidine 5'monophosphate (5'TMP).

The nucleotides act in cells as secondary messengers through cAMP (cyclic 5'AMP) and cGMP (cyclic 5'GMP), and also supply the necessary chemical energy. They can also act as components of many enzyme co-factors such as flavin adenine dinucleotide (FAD) and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), in addition to having a strong influence on sleep – the function which is the objective of the present study.

In reviewing the literature, we found that three nucleotides are considered to be involved in the physiological function of sleep – 5'UMP, 5'AMP, and 5'GMP.

The first, 5'UMP, is distributed throughout the body (including the brain), and has a depressive effect on the CNS. The nightly administration of low doses of this nucleotide produces a moderate increase in the number of REM and non-REM sleep episodes,⁴ but has little or no influence on their duration.^{5,6} The plasma concentration of uridine in mice has a marked circadian rhythm,⁶ with the time of the maximum concentration (acrophase) coinciding with the time of least activity.

The second, 5'AMP, is the nucleotide which is most referred to in the literature as a sleep inducer. Indeed, its hypnotic properties have been recognized now for over 30 years.⁷ More recent evidence confirming its role in sleep induction is based on several facts: extracellular concentrations (through the secondary messenger cAMP) present circadian variations, its administration induces an hypnotic effect, and its levels decline during the period of wakefulness.^{8–11}

The third, 5'GMP, is also a second messenger in its cyclic form (cGMP), which mediates most of the neuronal effects of nitric oxide (NO). Many studies have pointed to the role of NO in sedation. For instance, the injection of a cGMP inhibitor into rats was found to increase wakefulness at the same time as suppressing REM and non-REM sleep.¹² Human studies have shown that cGMP plasma concentrations rise when the subject goes to bed and remain high throughout the night, reflecting its role in stimulating the secretion of the pineal hormone melatonin.^{13,14}

Recently there has been growing interest in studying nucleotides in the diet, since they seem to play an important role in human nutrition at different stages of life. This is especially so in infancy, as they influence neonatal development by the synthesis of

phospholipids, by modifying the microflora and repairing any damage in the gut, and also by participating in the T-lymphocyte mediated immune response.^{15–18} It has been suggested that both the nucleotides and the nucleosides found in human milk may be important for tissue development in infants.¹⁹

The Co-ordinated International Expert Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN) recommends the following maximum concentrations for nucleotides added to infant formulas: 1.75 mg/100 kcal of 5'CMP, 1.5 mg/100 kcal of 5'UMP, 1.5 mg/100 kcal of 5'AMP, 0.5 mg/100 kcal of 5'GMP, and 1 mg/100 kcal of 5'IMP. Also, the total of all nucleotides must not exceed 5 mg/100 kcal.²⁰

Although the most extensively validated method for nucleotide assay in human milk is high performance liquid chromatography (HPLC), our research group has demonstrated that capillary electrophoresis (CE) is another perfectly viable technique.²¹ Nearly all nucleotide determinations have studied the variations in their concentrations over the months of lactation. The novelty of the present work is the study of the possible circadian rhythms in the nucleotide content of breast-milk by determining the changes that occur during each 24-h period. This is essentially the reason for using CE as against HPLC, since measurements with CE are significantly faster (approximately 30 min compared with 2 h in HPLC). Also, the efficiency of the method is much greater (more than 200,000 plates theoretically, compared with 5000 for HPLC), and the expenditure in terms of the volumes of reagents and samples is much lower.

Subjects and methods

Subjects

The study population consisted of 30 healthy mothers from the region of Extremadura (Spain) who had been breast-feeding for 3 months. Their median age was 33 years (minimum-to-maximum range, 26–39 years), and the mean \pm SD values for weight, height, and body mass index (BMI) were 62.3 ± 7.3 kg, 164 ± 6 cm, and 23.1 ± 2.4 kg/m², respectively. The subjects were considered healthy on the basis of their breast-feeding success, a physical examination, and a follow-up. All subjects were informed about the investigation, and gave their written consent.

During the study, the subjects took no drugs that would disturb the levels of nucleotides. The Ethical Investigation Committee of University of Extremadura approved the study.

Samples

Samples of breast-milk were collected in polystyrene tubes before each feed over a 24-h period, during March to July, and stored frozen at -30°C until assay in duplicate. In general, between 6 and 8 samples of breast-milk were obtained from each mother.

Equipment and components

The CE system used was a P/ACE MDQ System 5510 equipped with a diode array detector (Beckman Coulter, Inc., USA). The system can be rapidly reconfigured from a flexible research platform to a tightly regulated routine-use platform. Automated fractionation of a detected peak allows isolation of newly resolved compounds for external identification.

Capillary cartridges

The capillaries are housed in user-assembled cartridges which are compatible with all current CE capillaries. For the present study of nucleotides, the CE separations were carried out in an uncoated silica capillary ($75\ \mu\text{m}$ i.d. \times $375\ \mu\text{m}$ o.d.; Polymicro Technologies[®], LLC, USA) with an effective length of 20 cm.

Detector modules

To allow for flexible method development and rugged routine use, the design of the P/ACE MDQ makes it easy to interchange high-sensitivity diode array (DAD), UV/Vis, and laser-induced fluorescence (LIF) detection modules. An external detector adapter allows the capillary to be extended to additional detection systems.

Software for the CE analysis

The 32Karat[™] software package specific to capillary electrophoresis includes mobility plot generation, advanced reports, and new 2-D algorithms to couple mobility and spectral signatures for peak identification. All of this results in a fully integrated CE control and data analysis workstation.

The methods are defined and edited in table format. All functions for the system are handled in a single window, including programming of the buffer array for the automation of strategies for the development of methods, using filters such as scan range, wavelength maximum, and mobility.

Control and analysis

Peak identification using either time or mobility, coupled with spectral signature confirmation, creates powerful 2-D peak identification schemes.

Velocity-calibrated peak area and CAESAR[®] integration ensure reproducible quantification at low limits of detection.

Reagents

Adenosine 5' monophosphate, uridine 5' monophosphate, guanosine 5' monophosphate, thymidine 5' monophosphate, cytidine 5' monophosphate, inosine 5' monophosphate boric acid, and sodium dodecyl-sulphate (SDS) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). All other chemicals were of analytical purity grade. Perchloric acid 60%, sodium hydroxide and potassium hydroxide 85% pellets were purchased from Panreac, Spain. All solutions were prepared using de-ionized water (Milli-Q System).

Procedures

Preparation of stock solutions

The values reported in the literature indicated that the nucleotide concentrations in human milk would be in the range 0–9 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Stock nucleotide solutions were, therefore, prepared in the following concentrations: 10, 5, 1, and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 5'AMP, 5'CMP, 5'GMP, 5'TMP, 5'UMP, and 5'IMP.

Extraction of nucleotides from breast-milk

We followed the technique of Perrin *et al.*²² with certain modifications. We started from milk samples of healthy women of at least 12 weeks' lactation. Aliquots of 0.75 ml of each sample were hydrolysed with 0.75 ml of 13% perchloric acid, mixing for 45 min on a roller mixer. After centrifuging at 5000 g for 20 min at room temperature, the supernatant was collected, discarding the fatty halo.

The solution was then adjusted to neutral pH with 5 M KOH, and left in an ice bath for 1 h for all the potassium perchlorate to precipitate. It was then filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millex; Millipore, USA) before assay.

CE analysis

All experiments were performed on a P/ACE System 5510 (Beckman Coulter). The CE separations were carried out in an uncoated silica capillary ($75\ \mu\text{m}$ i.d. \times $375\ \mu\text{m}$ o.d.; Polymicro Technologies) with an effective length of 20 cm. Detection was by UV light over the range 190–300 nm (cartridge detection window $100\ \times$ $800\ \mu\text{m}$) and the limit of detection (LOD) was 60 ng/ml.

Samples were loaded by low-pressure injection (3.45 kPa) for 6 s (14.3 nl, 2.7% of the total capillary volume injected). Borate buffers were prepared from boric acid, then SDS was added, and the solution was adjusted with 500 g/l NaOH to the appropriate pH. The capillary was washed at the beginning of each working day with de-ionized water, 0.1 M sodium hydroxide, water, and finally with a separation buffer for 5 min.

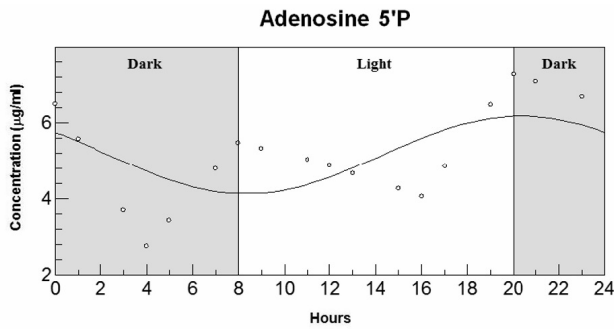


Figure 1 Sinusoidal function obtained by cosinor analysis of the nucleotide 5'AMP for a 24-h period (*n* = 30)

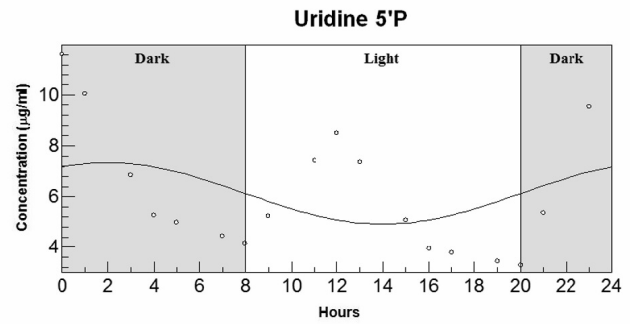


Figure 2 Sinusoidal function obtained by cosinor analysis of the nucleotide 5'UMP for a 24-h period (*n* = 30)

Between runs, it was rinsed with water for 1 min and with a separation buffer for 2 min. The assays were run at constant voltage using a ramp of 1 min. The alkaline (borate) separation system as described by Adam *et al.*²³ was used as follows. The capillary was operated at 30°C. The separation buffer was prepared from boric acid (60 mmol/l), SDS (80 mmol/l), and adjusted with 2-amino-2-methyl-1-propanol to neutral pH. Assays were run at +10 kV (positive outlet). The detector's data rate was set at 4 Hz.

Chronobiological analysis

The chronobiological analysis of the data was performed using Ritme® for Windows software package. The rhythmicity of each nucleotide was studied by cosinor analysis.²⁴ The sinusoidal function used for the fit is the following:

$$y(t) = M + A \times \cos [(2 \times \pi/\tau) \times t - \Phi] \quad \text{Eq. 1}$$

where *y*(*t*) is the value of the cosine function at time *t*, *M* is the mean level of oscillation or the MESOR (acronym of midline-estimating statistic of rhythm, the mean value about which the oscillation occurs, equal to the arithmetic mean of equidistant data covering a whole number of cycles), *A* is the amplitude (measure of the extent of a rhythmic change in a cycle as estimated by the sinusoidal function that best fits the data), the frequency ($\omega = 2 \times \pi/\tau$) where π is the number pi and τ is the period (24 h in our case), and Φ is the acrophase (a phase angle measuring the timing of the peak activity, expressed as the lag from a reference time to the crest time of the best fit sinusoidal function). Therefore, cosinor analysis determines the best-fitting sinusoidal wave by estimating three parameters – mesor, amplitude, and acrophase.

Sample distribution

Given that the times at which milk samples were extracted did not exactly coincide from one mother to another, we selected those hours of the 24-h period for

which there were the greatest numbers of samples under the constraint of requiring reasonably uniform distribution of those hours.

By cosinor analysis, we determined the confidence limits of the MESOR, amplitude, and acrophase at 95% probability level. When the range determined by the confidence limits of the amplitude contains the value 0, it cannot be excluded that the amplitude is 0 and, therefore, the existence of a rhythm is not statistically significant. In other words, to test the statistical significance of the rhythm, we determined whether the null hypothesis of zero amplitude is or is not rejected at 0.05 of alpha level. The *P*-value indicates the significance of the fit of the cosine curve to the data.

The confidence limits of the acrophase allow one to determine whether there were significant differences between the acrophases of different variables. When the range determined by the confidence limits of the acrophase of one variable overlaps that of another, the possibility that both acrophases are equal cannot be discarded.²⁵

Results

Figure 1 shows the levels of 5'AMP in human milk over a 24-h period. The levels increase as night falls (after 20:00), and the levels are higher at the first hours of the night relative to the interval before dawn.

Figure 2 shows the equivalent results for 5'UMP. In this case, there was an increase in the middle of the night with respect to the previous hours and with respect to the light hours.

Figures 3–6 present the results for the other four nucleotides (5'GMP, 5'CMP, 5'IMP, and 5'TMP) in which variations between the different time hours showed no difference. In Figure 3, however, there was an apparent increasing trend of the levels of 5'GMP for the nocturnal period (20:00–08:00). A similar

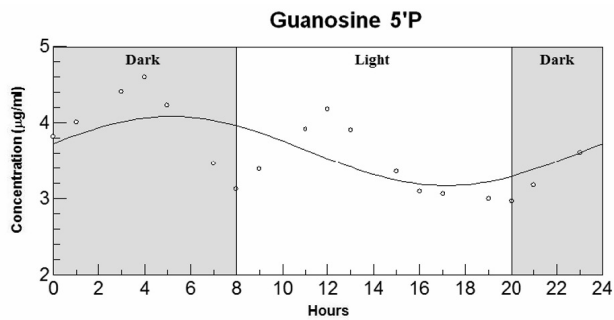


Figure 3 Sinusoidal function obtained by cosinor analysis of the nucleotide 5'GMP for a 24-h period ($n = 30$)

trend, but during daylight hours (08:00–20:00), is observed for 5'CMP and 5'IMP (Figs 4 and 5, respectively). This contrasts with the apparent downward trend in the daylight intervals for 5'AMP (Fig. 1).

The results of the chronobiological study (Table 1) of particular interest were the significant circadian rhythms of 5'AMP (Fig. 1) and 5'GMP (Fig. 3) with acrophases during the period of darkness (at 20:19 and 05:08, respectively). The other two nucleotides having significant circadian rhythms were 5'CMP (Fig. 4) and 5'IMP (Fig. 5) but with acrophases during the daytime period (at 18:40 and 19:14, respectively).

Discussion

Breast-milk is not static in its composition, but changes with time,^{26,27} in parallel with the infant's energy demands and tissue growth. For the newborn, there is an accentuated protein demand because of the anabolic requirement involved in the first weeks of growth.

Nonetheless, there has until now been no consideration of the possibility that, through her milk, the mother is preparing her baby's adaptation to the changing environment – day and night, for example. It is now known that high levels of melatonin in breast-milk appear during the night and low levels during the day.²⁸ Since melatonin is the hormone that regulates the

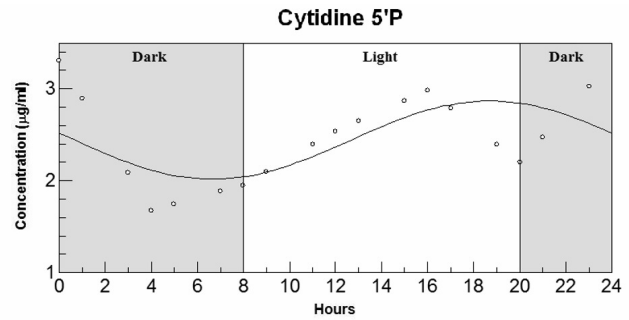


Figure 4 Sinusoidal function obtained by cosinor analysis of the nucleotide 5'CMP for a 24-h period ($n = 30$)

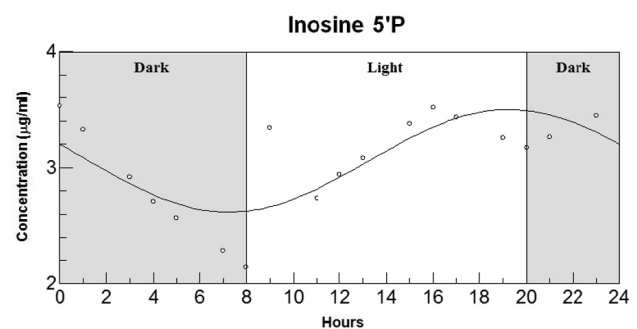


Figure 5 Sinusoidal function obtained by cosinor analysis of the nucleotide 5'IMP for a 24-h period ($n = 30$)

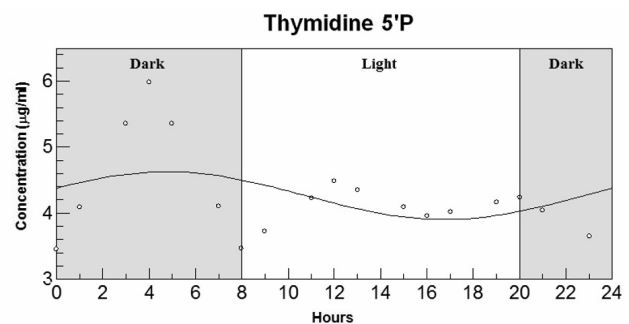


Figure 6 Sinusoidal function obtained by cosinor analysis of the nucleotide 5'TMP for a 24-h period ($n = 30$)

sleep/wake cycle, these changes in breast-milk will doubtless be the signal to help the baby adapt as quickly

Table 1 Chronobiological parameters of each nucleotide for a 24-h period

Nucleotide	MESOR ($\mu\text{g/ml}$)	Amplitude ($\mu\text{g/ml}$)	Acrophase (h:min)	Cosinor significance P -value
5'AMP	5.17 (4.61–5.73)	1.03 (0.02–2.03)	20:19 (15:08–25:30)	0.04457*
5'UMP	6.14 (4.91–7.37)	1.20 (–)	02:00 (–)	0.36425
5'GMP	3.63 (3.42–3.85)	0.46 (0.07–0.84)	05:08 (01:18–08:58)	0.01955*
5'CMP	2.44 (2.25–2.64)	0.42 (0.16–0.68)	18:40 (14:59–22:20)	0.01645*
5'IMP	3.06 (2.91–3.21)	0.44 (0.18–0.70)	19:14 (16:48–21:41)	0.00149*
5'TMP	4.27 (3.94–4.60)	0.36 (–)	04:45 (–)	0.28860

MESOR values and amplitudes are in the corresponding parameter units. Acrophases are given as times of day (08:00–20:00 light/dark cycle). Confidence limits are in parentheses. The P -value indicates significance of the fit of the cosine curve to the data.

* $P < 0.05$ was considered statistically significant ($n = 30$).

as possible to the day/night versus sleep/wakefulness environment.^{29–31}

The present study continues this line of inquiry into the change and temporal evolution of the macro- and micro-nutrients in breast-milk. Our purpose was to study some of the possible variations, but on a much shorter time scale, in particular the 24-h period variation of the nucleotides belonging to the non-protein nitrogen fraction. As was first described some 30 years ago and has been confirmed in recent years, these nucleotides have a great genetic importance³² via their action on the flora in the gut,¹⁵ and neurochemically via their intracellular action as secondary messengers, particularly the physiological action of the purine nucleotides on sleep.⁸ Also, in the last few years, their hypnotic action in infants has been demonstrated by the results of applied research with starter milks for infants with sleep problems.^{21,30,31}

The higher nocturnal levels of the purine nucleotide 5'AMP were consistent with its nature as a sleep inducer as found in earlier studies.^{33–35} In addition, as a novel result compared to those reported by other workers,³⁶ we demonstrated the existence of a circadian rhythm for this nucleotide. The increase was confined to the beginning of the night (with acrophase at 20:19, and a MESOR of 5.17 µg/ml), and could mean that the cAMP which is used in the release of GABA, an inhibitory and 'sleep-promoting' neurotransmitter,³⁷ originates from this nucleotide in the milk. It is notable that the increase of this nucleotide coincides with the onset of darkness at 20:00, and that the raised levels are maintained over a long time to conserve the cAMP-mediated intracellular response, especially in brain tissue in order to maintain homeostasis during sleep.³⁴

The other purine nucleotide, 5'GMP, showed a tendency to increase during the night, unlike the periods of daylight during which its levels were more irregular. This nucleotide is a precursor of another intracellular messenger (cGMP) which, during the night, is involved in the secretion of the hormone melatonin, thereby inducing and entraining nocturnal rest.^{13,38,39} Our chronobiological study showed this nucleotide to have a clear circadian rhythm, with the acrophase in the final hours of darkness, at 05:08 (an acrophase that is very similar to that reported by Skala *et al.*³⁶) and a MESOR of 3.63 µg/ml.

With respect to 5'UMP, this nucleotide did not describe a clear circadian rhythm, but its concentrations gradually decreased during the hours of daylight, followed by a clear increasing trend during the period of darkness, indicating a possible ultradian rhythm, which is understood as being part of the

stimulation and functioning of the hypnotic mechanism.^{4–6,40}

Of the other nucleotides, 5'CMP had a significant circadian rhythm with acrophase at 18:40 (during daylight hours), and a MESOR of 2.44 µg/ml. Because 5'IMP is the precursor of the other two purine nucleotides, it was not surprising that it showed a significant circadian rhythm that was in synchrony with the other two purine nucleotides, 5'AMP and 5'GMP. Indeed, its acrophase was at 19:14 (just before the onset of darkness when the sleep inducers, 5'AMP and 5'GMP, reach their acrophases) and its MESOR was 3.06 µg/ml.

Conclusions

The assay of nucleotides in the breast-milk of the study population showed that their levels were not constant over a 24-h period. This was particularly so for 5'AMP, 5'UMP, and 5'GMP, which showed increased concentrations at night and may, therefore, be involved in inducing hypnotic action in the infant.

Acknowledgements

Laboratorios Ordesa S.L. financed this work through project 167/06. Thanks are also due to the University of Extremadura for the research grant 'II Plan de Iniciación a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación' awarded to Cristina L. Sánchez López, and to Elena Circujano for her technical assistance.

References

1. World Health Organization. Promoting appropriate feeding for infants and young children. In: *Global strategy for infant and young child feeding*. Geneva: WHO, 2003; 7–8.
2. Commission of the European Communities. Council Directive. No. 2006/141/EC. Official Journal of the European Communities 2006; 22 December L 401/1.
3. Duchén K, Thorell L. Nucleotide and polyamine levels in colostrum and mature milk in relation to maternal atopy and atopic development in the children. *Acta Paediatr* 1999; **88**: 1338–1343.
4. Kimura T, Ho IK, Yamamoto I. Uridine receptor: discovery and its involvement in sleep mechanism. *Sleep* 2001; **24**: 251–260.
5. Inoué S. Sleep-promoting substance (SPS) and physiological sleep regulation. *Zool Sci* 1993; **10**: 557–576.
6. Naguib FN, Soong SJ, el Kouni MH. Circadian rhythm of orotate phosphoribosyltransferase, pyrimidine nucleoside phosphorylases and dihydrouracil dehydrogenase in mouse liver. Possible relevance to chemotherapy with 5-fluoropyrimidines. *Biochem Pharmacol* 1993; **45**: 667–673.
7. Haulica I, Ababei L, Branisteanu D *et al.* Preliminary data on the possible hypnogenic role of adenosine [Letter]. *J Neurochem* 1973; **21**: 1019–1020.
8. Dunwiddie TV, Worth T. Sedative and anticonvulsant effects of adenosine analogs in mouse and rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; **220**: 70–76.

9. Virus RM, Djuricic-Nedelson M, Radulovacki M *et al.* The effects of adenosine and 2'-deoxycoformycin on sleep and wakefulness in rats. *Neuropharmacology* 1983; **22**: 1401–1404.
10. Radulovacki M. Role of adenosine in sleep in rats. *Rev Clin Basic Pharm* 1985; **5**: 327–339.
11. Porkka-Heiskanen T, Alanko L, Kalinchuk A *et al.* Adenosine and sleep. *Sleep Med Rev* 2002; **6**: 321–332.
12. Ribeiro AC, Kapas L. The effects of intracerebroventricular application of 8-Br-cGMP and LY-83,583, a guanylyl cyclase inhibitor, on sleep-wake activity in rats. *Brain Res* 2005; **1049**: 25–33.
13. Zhdanova IV, Simmons M, Marcus JN *et al.* Nocturnal increase in plasma cGMP levels in humans. *J Biol Rhythms* 1999; **14**: 307–313.
14. Zhdanova IV, Raz DJ. Effects of melatonin ingestion on cAMP and cGMP levels in human plasma. *J Endocrinol* 1999; **163**: 457–462.
15. Gil A, Sánchez-Medina F. Acid-soluble nucleotides of cow's, goat's and sheep's milks, at different stages of lactation. *J Dairy Res* 1981; **48**: 35–44.
16. Barness LA. Dietary sources of nucleotides – from breast milk to weaning. *J Nutr* 1994; **124**: 128S–130S.
17. Carver J. Dietary nucleotides: cellular immune, intestinal and hepatic system effect. *J Nutr* 1994; **129**: 144–148.
18. Martinez-Augustin O, Boza JJ, Navarro J *et al.* Dietary nucleotides may influence the humoral immunity in immunocompromised children. *Nutrition* 1997; **13**: 465–469.
19. Sugawara M, Sato N, Nakano T *et al.* Profile of nucleotides and nucleosides of human milk. *J Nutr Sci Vitaminol* 1995; **41**: 409–418.
20. Koletzko B, Goulet O, Hunt J *et al.* Report on the guidelines on parenteral nutrition in infants, children and adolescents. *Clin Nutr* 2005; **24**: 1105–1109.
21. Cubero J, Narciso D, Terron P *et al.* Chrononutrition applied to formula milks to consolidate infants' sleep/wake cycle. *Neuro Endocrinol Lett* 2007; **28**: 360–366.
22. Perrin C, Meyer L, Mujahid C *et al.* The analysis of 5'-mononucleotides in infant formulae by HPLC. *Food Chem* 2001; **74**: 245–253.
23. Adam T, Friedecky D, Fairbanks LD *et al.* Capillary electrophoresis for detection of inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Clin Chem* 1999; **45**: 2086–2093.
24. Halberg S, Tong YL, Johnston EA. *Cellular aspects from biorhythms*. New York: Springer, 1967.
25. Pelegrí C, Vilaplana J, Castellote C *et al.* Circadian rhythms in surface molecules of rat blood lymphocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; **284**: 67–76.
26. Lawrence. La lactancia materna. In: *Una guía para la profesión médica*. Madrid: Mosby/Doyma, 1996.
27. Dupont C. Protein requirements during the first year of life. *Am J Clin Nutr* 2003; **77**: 1544S–1549S.
28. Illnerová H, Buresová M, Presl J. Melatonin rhythm in human milk. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; **77**: 838–841.
29. Cubero J, Valero V, Sánchez J *et al.* The circadian rhythm of tryptophan in breast milk affects the rhythms of 6-sulfatoxymelatonin and sleep in newborn. *Neuro Endocrinol Lett* 2005; **26**: 657–661.
30. Cubero J, Narciso D, Aparicio S *et al.* Improved circadian sleep-wake cycle in infants fed a day/night dissociated formula milk. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; **27**: 373–380.
31. Aparicio S, Garau C, Esteban S *et al.* Chrononutrition: use of dissociated day/night infant milk formulas to improve the development of the wake-sleep rhythm. Effects of tryptophan. *Nutr Neurosci* 2007; **10**: 137–143.
32. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Nucleotidos y ácidos nucleicos. In: Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. (eds) *Principios de Bioquímica*. Barcelona: Omega, 2005, 324–357.
33. Chagoya de Sánchez V, Hernández-Munoz R, Suárez J *et al.* Temporal variations of adenosine metabolism in human blood. *Chronobiol Int* 1996; **13**: 163–177.
34. Paquereau J. Physiology of normal sleep. *Rev Prat* 2007; **57**: 1529–1541.
35. Landolt HP. Sleep homeostasis: a role for adenosine in humans? *Biochem Pharmacol* 2008; **75**: 2070–2079.
36. Skala JP, Koldovsky O, Hahn P. Cyclic nucleotides in breast milk. *Am Soc Clin Nutr* 1981; **34**: 343–350.
37. Harrison NL. Mechanisms of sleep induction by GABA(A) receptor agonists. *J Clin Psychiatry* 2007; **68**: 6–12.
38. Liu C, Ding JM, Faiman LE *et al.* Coupling of muscarinic cholinergic receptors and cGMP in nocturnal regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *J Neurosci* 1997; **17**: 659–666.
39. Tischkau SA, Weber ET, Abbott SM *et al.* Circadian clock-controlled regulation of cGMP-protein kinase G in the nocturnal domain. *J Neurosci* 2003; **23**: 7543–7350.
40. Honda K, Komoda Y, Nishida S *et al.* Uridine as an active component of sleep-promoting substance: its effects on nocturnal sleep in rats. *Neurosci Res* 1984; **1**: 243–252.

Analysis of the Antioxidant Activity in Human Milk, day vs. night

Javier Cubero¹, Cristina L. Sánchez², R. Bravo², Javier Sánchez³, Ana B. Rodríguez², M. Rivero², Carmen Barriga²

¹Didactic Area of Experimental Science. UEX. Badajoz. Spain.

²Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Group. Faculty of Science. UEX. Badajoz. Spain.

³Laboratory of Metabolism. Hospital "Perpetuo Socorro" (S.E.S.). Badajoz. Spain.

⁴General Scientific Manager, Grupo Ordesa. Barcelona. Spain.

ABSTRACT

Human milk has many advantages for the development of the breast-fed baby, among vitamins A, C and E, which are essential as an antioxidant defense. In newborn infants, oxidative stress is important due to the immaturity of the antioxidant defense mechanisms and the digestive system. It is well known that the components of breast milk are not constant throughout the 24 hour period. This variation can depend on the mother's diet during this period. The aim of the study was to analyze the antioxidant capacity of the human milk throughout the 24 hour period, and to study the antioxidant changes between day and night period. The levels of Trolox Equivalent were statistically significant ($P < 0,01$), in the milk samples collected at 18:00h and 21:00h compared to the samples collected at 24:00h. We observed an increase in the antioxidant capacity in the samples of the night period compared to the samples of the diurnal period, probably as consequence of the immunological activity of the mother and the amount of vitamins and proteins in the mothers' diet during the day.

Key words: human milk, antioxidant, chronobiology.

ABBREVIATIONS

TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity.

WHO : World Health Organization.

UNICEF : United Nations Children's Fund.

INTRODUCTION

A joint declaration by the World Health Organization (WHO) and the United Nations Children's Fund (UNICEF) stated that, breast milk is the optimal food for infants and can never be equaled by artificial substitutes. It covers all the child's physiological and nutritional needs during the first 4–6 months of life (WHO, 2003).

It is well known the advantages of the human milk for the development of the breastfed baby, among vitamins A, C and E, which are essential as an antioxidant defense. In newborn infants, oxidative stress is important due to the immaturity of the antioxidant defense mechanisms and the digestive system. The purpose of the antioxidative defense is to inactivate reactive oxygen particles (Tsopmo et al., 2009).

Human milk antioxidant capacity value represents a complex mixture of numerous compounds with antioxidant activities functioning by different chemical reactions (Friel et al., 2002; Kitts et al. 2003; Silvestre et al. 2008), which collectively culminate in a stable food source for the breastfed infant.

Vitamins E and C, retinol and b-carotene, lactoferrin and glutathione, and antioxidant enzymes including catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase are all present in human milk (Friel et al., 2002; Shoji et al., 2004; Kasapovic et al., 2005), and are known to have specific antioxidant roles against lipid peroxidation.

Earlier studies reported that breast milk is not constant throughout the 24 hour period (Cubero et al., 2005; Sánchez et al., 2009). This variation can depend on the mother's diet during this period (Sánchez et al., 2008).

The aim of the study was to analyze the antioxidant capacity of the human milk throughout the of 24 hour period, the antioxidant changes between the day and the night.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

We recruited 7 healthy mothers from the region of Extremadura (Spain), in the Service of Neonatology (Hospital "Perpetuo Socorro", S.E.S.).

The subjects were considered healthy on the basis of their breast-feeding success, a physical examination, and a follow-up. All subjects were informed about the research project and gave written consent.

During the study, the subjects took no drugs that would disturb the levels of vitamins. The Ethical Investigation Committee of University of Extremadura approved the study.

Samples

Milk samples were collected from 7 breastfeeding women between 1-5 days postpartum (colostral milk) in polystyrene tubes before each feed over 24h (Hanna et al., 2004), during March to July and stored frozen at 80°C until analysis in duplicate.

Antioxidant analysis

We used an adapted technique from Arnao et al. (2001). The antioxidant capacity was determined by the improved spectrophotometric method TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). This method calculates the percentage inhibition of the cation radical ABTS- + by Trolox, a water soluble analogue of alpha-tocopherol which is the standard antioxidant. The samples analysis was performed on a microplate

reader TECAN M200. The wavelength device was 730nm.

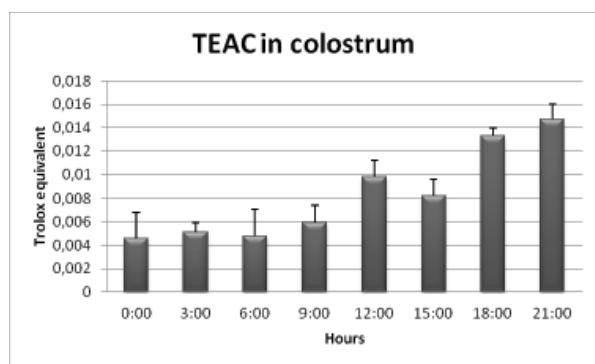
Statistical analysis

For the statistical analysis it was used: descriptive statistics (mean \pm standard deviation) and inferential test Non-parametric Kruskal-Wallis. A value of $P < 0.01$ was considered to be significant.

RESULTS

We found variation in the antioxidant activity between the night and diurnal samples of human milk. The levels of Trolox Equivalent are statistically significant ($P < 0.01$) in the samples collected at 18:00h and 21:00h opposite to the samples of milk collected at 24:00h (figure 1).

DISCUSSION AND CONCLUSION



* $p < 0,01$ respect to 0:00h.

Figure 1. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) in colostrum human milk (24h period).

Studies show human milk can suppress oxidative stress and oxidative DNA damage in newborn infants more effectively than infant formula and indicate that human milk contains a unique defense mechanism, which is not available in commercial infant formulas or in bovine milk (Shoji et al., 2004).

The influence of human milk on oxidative stress intensity in breast-fed neonates and infants is a significant issue. The concentration of antioxidants in milk depends on mother's diet, vitamins supplementation during pregnancy and lactation and geographical area of domicile (Szalagatys-Sidorkiewicz et al., 2004).

As Asghar et al. reported (2009), we observed an increase in the total antioxidant status at the beginning of the night period opposite to the diurnal period, probably as consequence of the immunological activity of the mother and the amount of vitamins and proteins (Yamawaki et al., 2005) in the mothers' diet during the day.

In the future, this study should be improved by 24h-questionnaires from the breastfeeding women, at the

point to observe which the origin of the antioxidants substances is in human milk. Probably, a specific antioxidant test should be used.

Acknowledgments

This research was supported financially by the Ordesa Group. We are grateful to Ms. Elena Circujano and the medical staff of the hospital for technical help.

References

- Arnao MB, Cano A, Alcolea JF, Acosta M. 2001. Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigment extracts. *Phytochem Anal.* 12: 138-143.
- Asghar Z, Fatemeh T, Taiebeh C, Gholamreza S, Mohsen K. 2009. Antioxidant and radical scavenging activity of human colostrum, transitional and mature milk. *J Clin Biochem Nutr.* 45: 150-154.
- Cubero J, Valero V, Sánchez J, Rivero M, Parvez H, Rodríguez AB, Barriga C. 2005. The circadian rhythm of tryptophan in breast milk affects the rhythms of 6-sulfatoxymelatonin and sleep in newborn. *Neuro Endocrinol Lett.* 26: 657-661.
- Friel JK, Martin SM, Langdon M, Herzberg GR, Buettner GR. 2002. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. *Pediatr Res.* 51: 612-618.
- Hanna N, Ahmed K, Anwar M, Petrova A, Hiatt M, Hegyi T. 2004. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89: 518-520.
- Kasapovic J, Pejic S, Mladenovic M, Radlovic N, Pajovic SB. 2005. Superoxide dismutase activity in colostrum, transitional and mature human milk. *Turk J Pediatr.* 47: 343-347.
- Kitts DD, Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources: applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des.* 9: 1309-1323.
- Sánchez CL, Cubero J, Sánchez J, Chanclón B, Rivero M, Rodríguez AB, Barriga C. 2009. The possible role of human milk nucleotides as sleep inducers. *Nutr Neurosci.* 12: 2-8.
- Sánchez CL, Rodríguez AB, Sánchez J, González R, Rivero M, Barriga C, Cubero J. 2008. Calcium intake nutritional status in breastfeeding women. *Arch Latinoam Nutri.* 58: 371-376.
- Shoji H, Shinohara K, Oguchi S, Shiga S, Yamashiro Y. 2004. Suppressive effects of breast milk on oxidative DNA damage in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 89: 136-138.
- Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareno E, Roerao FJ. 2008. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr.* 97: 1070-1074.
- Szalagatys-Sidorkiewicz A, Zagierski M, Renke J, Korzon M. 2004. Antioxidative properties of human milk. *Med Wieku Rozwoj.* 8: 353-358
- Tsopmo A, Diehl-Jones B, Aluko R, Kitts D, Elisia I, Friel J. 2009. Tryptophan released from mother's milk has antioxidant properties. *Pediatr Res* 66: 614-618.
- Yamawaki N, M Yamada, T Kan-no, T Kojima, T Kojima, T Kaneko, A Yonekubo. 2005. Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *Epidemiology.* 19: 171-181.
- World Health Organization (WHO). 2003. Promoting appropriate feeding for infants and young children. In: *Global strategy for infant and young child feeding.* World Health Organization: Geneva, Switzerland. pp 7-8.

Original

Análisis del contenido en nitrógeno y proteínas de leche materna, día vs noche

C. L. Sánchez López¹, A. Hernández², A. B. Rodríguez¹, M. Rivero³, C. Barriga¹ y J. Cubero¹

¹Laboratorio de Crononutrición. Departamento de Fisiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Badajoz. España. ²Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Escuela de Ingeniería Agrónoma. Universidad de Extremadura. Badajoz. España. ³Manager de la División Científica. Grupo Ordesa. Barcelona. España.

Resumen

La leche materna es un fluido que va variando tanto durante la lactancia como durante las 24h del día. Nuestro objetivo fue determinar el efecto del día y la noche en el contenido de nitrógeno y proteínas en leche humana de tipo: calostro, transición y madura. Para ello se recogieron durante los meses de enero de 2008 a diciembre de 2008 muestras de leche materna de mujeres sanas de la Comunidad de Extremadura (España), con menos de dos meses de lactancia. Dividimos las muestras en tres grupos en función del tipo de leche: grupo de calostro (1-5 días postparto), grupo de transición (6-15 días postparto) y grupo de leche madura (> 15 días postparto). Todas las muestras se almacenaron congeladas a -80° C. Consideramos período de noche al comprendido entre las 20:00-08:00 horas y período diurno al comprendido entre las 08:00-20:00 horas. El análisis de las muestras de leche materna estuvo basado en el método Kjeldahl. El contenido proteico fue calculado partiendo del nitrógeno total x 6,25. El estudio estadístico fue descriptivo (media ± desviación estándar) e inferencial (test *T-Student*). El valor medio de nitrógeno total y contenido proteico de cada grupo fue el siguiente: Nitrógeno total de los grupos de calostro, transición y madura fue 0,30 ± 0,06 g/dL (período nocturno), 0,29 ± 0,05 g/dL (período diurno); 0,26 ± 0,04 g/dL (período nocturno), 0,25 ± 0,04 g/dL (período diurno); 0,22 ± 0,05 g/dL (período nocturno), 0,20 ± 0,04 g/dL (período diurno) respectivamente, produciéndose en este grupo variación estadística ($P < 0,05$). El contenido proteico de los grupos de calostro, transición y madura fue 1,88 ± 0,4 g/dL (período nocturno), 1,81 ± 0,3 g/dL (período diurno); 1,62 ± 0,3 g/dL (período nocturno), 1,59 ± 0,3 g/dL (período diurno); 1,35 ± 0,3 g/dL (período nocturno), 1,26 ± 0,3 g/dL (período diurno) respectivamente, produciéndose de nuevo en este grupo una variación estadística ($P < 0,05$). Aunque se observaron diferencias intergrupales de los valores de nitrógeno total y proteínas, es sólo en la población de madres con lactancia madura, donde los componentes analizados variaron significativamente entre el día y la noche.

(Nutr Hosp. 2011;26:511-514)

DOI:10.3305/nh.2011.26.3.4582

Palabras clave: Proteína. Nitrógeno total. Kjeldahl. Leche materna. Cronobiología.

Correspondencia: Cristina Lucía Sánchez López.
Laboratorio de Crononutrición. Departamento de Fisiología.
Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura.
Badajoz. España.
E-mail: crissanchez@unex.es

Recibido: 7-IX-2009.
1.ª Revisión: 30-X-2009
Aceptado: 22-XI-2009.

NITROGEN AND PROTEIN CONTENT ANALYSIS OF HUMAN MILK, DIURNALITY VS NOCTURNALITY

Abstract

Breast milk is changing with the progression of lactation and during a 24-h period. To determine the effect of diurnality or nocturnality on total nitrogen and protein content of the breast milk. We collected human milk samples from health mothers living throughout Community of Extremadura (Spain) from January 2008 to December 2008 with less than two months of lactation. We divided the samples in three groups: calostrual group (1-5 days postpartum), transitional group (6-15 days postpartum) and mature group (> 15 days postpartum). All samples were stored in a freezer at -80°C. We considered as day period between 08:00-20:00h and night period 20:00-08:00h. Analysis of the human milk samples was based on the Kjeldahl method. Protein contents were calculated from total nitrogen x 6,25. The statistical analysis of the data was descriptive (mean ± standard deviation) and inferential (*T-Student* test). No differences ($P > 0,05$) were found to exist among the contents of individual human milk samples. The mean contents of each component were as follows: Total nitrogen of calostrual, transitional and mature group was 0,30 ± 0,06 g/dL (night period), 0,29 ± 0,05 g/dL (day period); 0,26 ± 0,04 g/dL (night period), 0,25 ± 0,04 g/dL (day period); 0,22 ± 0,05 g/dL (night period), 0,20 ± 0,04 g/dL (day period) respectively, in this mature group with a statistical variation ($P < 0,05$). Protein content of calostrual, transitional and mature group was 1,88 ± 0,4 g/dL (night period), 1,81 ± 0,3 g/dL (day period); 1,62 ± 0,3 g/dL (night period), 1,59 ± 0,3 g/dL (day period); 1,35 ± 0,3 g/dL (night period), 1,26 ± 0,3 g/dL (day period) respectively, in this mature group with a statistical variation ($P < 0,05$). Although we observed differences in the nitrogen and protein content during the individual stages of lactation, it is just in the population of mature lactating women, where the components analyzed varied significantly between day and night.

(Nutr Hosp. 2011;26:511-514)

DOI:10.3305/nh.2011.26.3.4582

Key words: Protein. Total nitrogen. Kjeldahl. Breast milk. Cronobiology.

Introducción

La leche materna es un alimento natural producido por todos los mamíferos cuyo propósito primordial es su uso para la alimentación del recién nacido. Como tal, en sus componentes nutricionales, es un fluido dinámico y cambiante a lo largo del periodo de lactancia, y en particular, a nivel de su componente proteico.

La concentración de proteínas en la leche materna la debemos diferenciar en cuanto a la cantidad correspondiente en los primeros días de lactancia, entre 1º y el 5º, es decir la etapa de calostro, tiene menos concentración energética y un contenido más elevado de proteínas incluyendo IgA, lactoferrina, diversos minerales, colesterol y ácidos grasos esenciales, que en la leche madura. La leche de transición que está presente entre el 6º y el 15º día con respecto al calostro, disminuye la cantidad de inmunoglobulinas y aumenta las de lactosa, grasa y vitaminas. Por último la leche madura que es la que se produce desde el 15º hasta el final de la lactancia se caracteriza por poseer un nivel de proteínas reducido^{1,2,3}.

En la leche madura el contenido de proteína se encuentra establecido de un modo regular a la lactogénesis. En diversos mamíferos se ha observado la relación directa entre el crecimiento de sus crías y el contenido de proteínas y cenizas en la leche materna. La caseína constituye entre el 10 y el 50% del total de las proteínas y el lactosuero entre el 90 y el 50%. Siendo la caseína la principal fuente de aminoácidos, calcio y fósforo para el recién nacido. A su vez la concentración de proteínas del lactosuero va descendiendo a lo largo de la lactancia con lo que se produce un cambio en dicha proporción, aumentando en la leche madura el porcentaje de caseínas frente a lactosuero.

Pero, ¿qué ocurre con esa variación temporal a lo largo del día? Es decir, sobre un periodo de 24 horas, ¿los niveles proteicos son constantes o cambian sus niveles nocturnos frente a los diurnos? En el caso de otros nutrientes de la leche materna como monosacáridos, minerales y aminoácidos ya han sido descritos estos cambios⁴, con lo que deducimos que también podrían existir en las proteínas lácteas. A su vez, cabe indicar que determinadas hormonas y sustancias tampoco mantienen sus niveles estáticos a lo largo del día en la leche humana^{5,6,7}, en particular la hormona prolactina para la cual se describen en contrastadas referencias bibliográficas los cambios entre sus niveles nocturnos y diurnos en mujeres lactantes⁸, causa por la que dicha hormona podría generar con toda seguri-

dad cambios cuantitativos en la leche materna, pero ¿hasta qué punto dichos cambios hormonales podrían ejercer cambios cualitativos y en ese caso cuáles ocurrirían a nivel proteico? Deducimos que de producirse dicha variabilidad diurna y nocturna, ésta ocurriría cuando el periodo de lactancia es más prolongado, es decir, en leche madura, periodo en el cual la lactogénesis puede estar encarrilada a un ritmo de tomas ya constante.

Métodos

Se recogieron muestras de leche materna de madres sanas (n = 69) con menos de dos meses de lactancia, procedentes del Servicio de Neonatología del Hospital Materno Infantil (S.E.S.) de Badajoz, (España) de enero de 2008 a diciembre de 2008 (tabla I). Se les solicitó la recolección de muestras en todas las tomas administradas al bebé durante un periodo de 24 horas, obteniendo una media de 6 muestras al día por madre. Todas ellas fueron informadas previamente del estudio, entregando su consentimiento firmado para la participación en el mismo.

Dicho estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Extremadura y se siguieron las directrices de la Declaración de Helsinki.

Las muestras recogidas fueron divididas en tres grupos: grupo calostroal (1-5 días postparto), grupo de transición (6-15 días postparto) y grupo de leche madura (> 15 días postparto). Todas las muestras fueron almacenadas bajo congelación a -80 °C. Consideramos como el período de día entre 08:00-20:00h y el período de la noche 20:00-08:00h.

Análisis de N total y Proteína

Entre los componentes de la leche materna se encuentran la fracción nitrogenada no proteica (también conocida como NNP, en la que se incluyen los nucleótidos)⁷ y la fracción nitrogenada proteica. Para analizar el contenido proteico de las muestras a estudio, nos basamos en el método Kjeldahl, con el cual se obtiene el valor del nitrógeno de la leche (valor de nitrógeno total) siendo posteriormente multiplicado por un factor (6,25 en el caso de la leche materna) para llegar al valor de proteína. Para ello se usó un sistema digestor (Bloc Digest20, P-Selecta®) y un sistema destilador (Pro-NitroII, P-Selecta®).

Tabla I
Características antropométricas de la población a estudio (n = 69)

Grupo	N	Días de lactancia	Edad (años)	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)
Calostro	11	3 ± 1	35 ± 8	76 ± 8	1,64 ± 0,1	28,3 ± 4,0
Transición	27	8 ± 2	33 ± 5	73 ± 13	1,65 ± 0,1	26,9 ± 5,4
Madura	31	29 ± 20	34 ± 4	68 ± 11	1,64 ± 0,1	25,2 ± 3,9

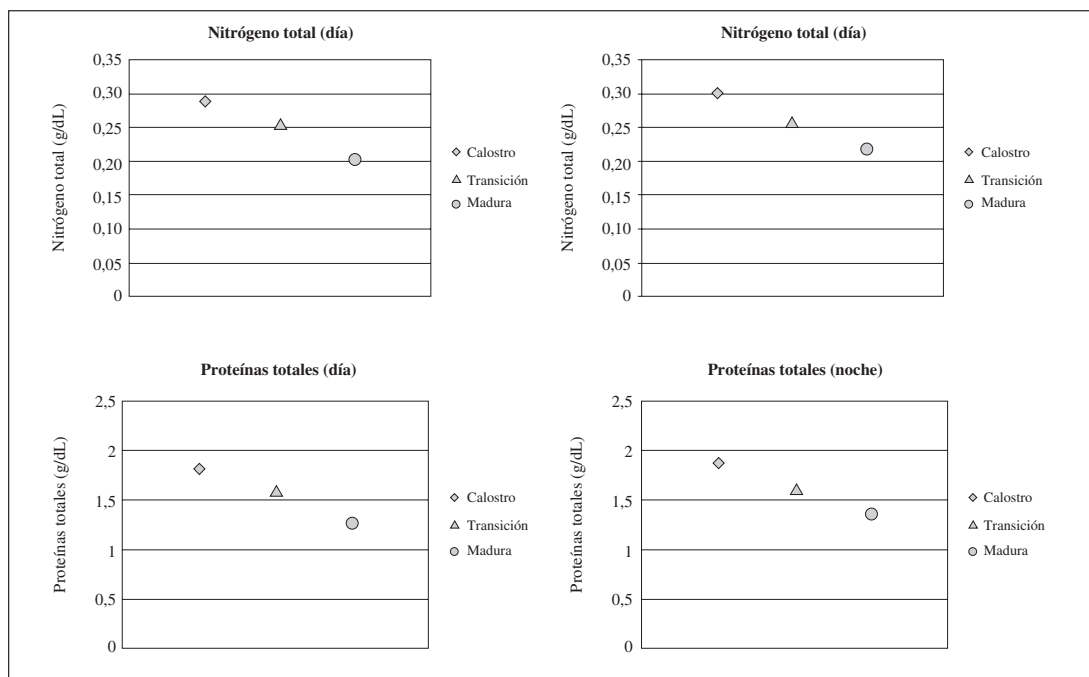


Fig. 1.—Cambios durante la lactancia (leche de calostro, transición y madura) y el día-noche de los valores de nitrógeno total y proteínas totales ($n = 69$).

Análisis estadístico

Se hallaron la media aritmética (\bar{x}) y la desviación estándar (DE) de todos los datos.

El estudio de la normalidad se realizó mediante el test de *Kolmogorov-Smirnoff*. Posteriormente se compararon las medias para distribuciones homogéneas de dos grupos apareados (día y noche) mediante el test *T-Student*. Se consideraron significativos los datos que presentaran un valor $P < 0,05$. El paquete estadístico utilizado fue SPSS® v.15.

Resultados

Tras el análisis de las muestras indicar que las variaciones no mostraron cambios estadísticamente significativos. Se considera como el período de día entre 08:00-20:00h y el período de la noche 20:00-08:00h. El contenido de nitrógeno total, encontrado en cada tipo de leche en dicha población a estudio, dividido a su vez en diurno y nocturno, fue el siguiente: Para el nitrógeno total del periodo calostro la concentración fue de $0,30 \pm 0,06$ g/dL (nocturna) y $0,29 \pm 0,05$ g/dL (diurna), para el grupo de periodo de transición $0,26 \pm 0,04$ g/dL (nocturna) y $0,25 \pm 0,04$ g/dL (diurna). Y para el grupo con leche madura fue de $0,22 \pm 0,05$ g/dL (nocturna) y $0,20 \pm 0,04$ g/dL (diurna) respectivamente, siendo en este grupo donde se produce una variación estadística ($P < 0,05$), en los niveles de nitrógeno total, aumentando en las muestras nocturna respecto a las diurnas (fig. 1).

Acerca del contenido de proteína láctea en esta población a estudio, para el grupo con leche de calostro se cuantificó una concentración de $1,88 \pm 0,4$ g/dL (nocturna) y $1,81 \pm 0,3$ g/dL (diurna), para el grupo de transición fue $1,62 \pm 0,3$ g/dL (nocturna) y $1,59 \pm 0,3$ g/dL (diurna). Y por último para el grupo con leche madura $1,35 \pm 0,3$ g/dL (nocturna) y $1,26 \pm 0,3$ g/dL (diurna) respectivamente, siendo en este grupo de nuevo donde se produce un incremento estadísticamente significativo ($P < 0,05$) en los niveles de proteína, entre las muestras diurnas y nocturnas (fig. 1).

Discusión

Con respecto a los resultados de nitrógeno total y proteína, observamos diferencias entre las tres etapas de lactancia, obteniéndose los mayores valores de ambos parámetros durante la etapa calostro. En las etapas posteriores, es decir, en transición y madura, aparece una disminución progresiva de estas variables, encontrándose las concentraciones mínimas en la leche madura.

Respecto a la variabilidad en un periodo de 24 horas entre muestras diurnas y nocturnas, cabe incidir que los valores de nitrógeno total y proteínas en las muestras nocturnas superaron ligeramente a los valores diurnos, coincidiendo con lo descrito por Cregan y cols.⁸ para la prolactina donde se observó un aumento de dicha hormona en la leche materna durante el periodo comprendido entre las 22:00 y las 10:00 horas. Por ello podría

ser consistente la idea de la variación de componentes en proteínas⁹, ya que existen cambios circadianos para otros macronutrientes como la lactosa, cuya menor concentración acontece en una población analizada a las 19:00 h¹⁰, mientras que para otros oligosacáridos dicha hora coincide con el momento de mayor concentración. A su vez para otros micronutrientes de la leche humana, dicha variabilidad circadiana ya ha quedado patente, como fue el caso de los minerales sodio y potasio y de elementos traza como: hierro, cobre y zinc^{11,12}.

Dicho incremento en las muestras del periodo nocturno, sobre todo en muestras pertenecientes a madres con lactancia instaurada y donde el periodo de tomas a lo largo del día se encuentra muy regulado y establecido de forma constante, podría deberse al balance energético de la madre y a su regulación hormonal a través de la lactancia, donde por ejemplo la leptina juega un papel determinante al disminuir sus niveles tras el periodo de lactancia, aumentando en modelo animal durante el periodo nocturno¹³.

Otra de las causas podría ser la pauta de temporalidad pandrial establecida por el lactante, donde en una lactancia madura son mayores las tomas durante el periodo diurno lo cual podría suponer que tras ese mayor número de ingestas el aporte proteico es menor que durante la noche, donde el periodo postpandrial es mayor debido al menor número de tomas, aunque como hándicap para el lactante, tendría menor digestibilidad y mayor carga renal durante la noche por los solutos derivados de la ingesta proteica¹⁴.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer su colaboración a todo el personal de la Unidad de Neonatología del Hospital Materno Infantil de Badajoz, así como a D^a Elena Circujano, técnico de nuestro laboratorio.

Referencias

1. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. Commentary on breast feeding and infant formulas, including proposed standards for formulas. *Pediatrics* 1976; 57: 278-285.
2. Kunz C, Lönnerdal B. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Paediatr* 1992; 81: 107-112.
3. Mitoulas LR, Kent JC, Cox DB, Robyn AO, JL Sherriff, Hartmann PE. Variation in fat, lactose and protein in human milk over 24 h and throughout the first years of lactation. *Br J Nutr* 2002; 88: 29-37.
4. Cubero J, Valero V, Sánchez J, Rivero M, Parvez H, Rodríguez AB, Barriga C. The circadian rhythm of tryptophan in breast milk affects the rhythms of 6-sulfatoxymelatonin and sleep in newborn. *Neuro Endocrinol Lett* 2005; 26: 657-661.
5. Cross NA, Hillman Ls, Forte LR. The effects of calcium supplementation, duration of lactation, and time of day on concentrations of parathyroid hormone-related protein in human milk: pilot study. *J Hum Lact* 1998; 14: 111-117.
6. Agrimonti F, Frairia R, Fornado D, Torta M, Borretta G, Trapani G, Bertino E, Angeli A. Circadian and circaseptan rhythmicities in corticosteroid-binding globulin (CBG) binding activity of human milk. *Chronobiologia* 1982; 9: 281-90.
7. Sánchez CL, Cubero J, Sánchez J, Chanclón B, Rivero M, Rodríguez AB, Barriga C. The possible role of human milk nucleotides as sleep inducers. *Nutr Neurosci* 2009; 12: 2-8.
8. Cregan MD, Mitoulas LR, Hartmann PE. Milk prolactin, feed volume and duration between feeds in women breastfeeding their full-term infants over a 24 h period. *Exp Physiol* 2009; 87: 207-214.
9. Lammi-Keefe CJ, Ferris AM, Jensen RG. Changes in human milk at 06:00, 10:00, 14:00, 18:00 and 22:00 h. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr* 1990; 11: 83-88.
10. Viverge D, Grimmonprez L, Cassanas G, Bardet L, Solare M. Diurnal Variations and within the feed in lactose and oligosaccharides of human milk. *Ann Nutr Metab* 1986; 30: 196-209.
11. Keenan BS, Buzek SW, Gaza C. Cortisol and its possible role in regulation of sodium and potassium in human milk. *Am J Physiol* 1983; 244: 253-261.
12. Picciano MF, Guthrie HA. Copper, iron, and zinc contents of mature milk. *Am J Clin Nutr* 1976; 29: 242-254.
13. Vernon RG, Denis RG, Sorensen A, Williams G. Leptin and the adaptations of lactation in rodents and ruminants. *Horm Metab Res* 2002; 34: 678-685.
14. Rodríguez J. Fisiología del equilibrio hidroelectrolítico en el recién nacido y lactante. *Bol. S. Vasco-Nav Pediatr* 2000; 34: 77-80.

Screening for Human Milk Amino Acids by HPLC-ESI-MS/MS

Cristina Lucia Sánchez López · Javier Cubero · Javier Sánchez · Lourdes Franco · Ana Beatriz Rodríguez · Montserrat Rivero · Carmen Barriga

Received: 5 January 2011 / Accepted: 12 April 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Amino acids have a determining effect on the nutritional status of the newborn, and their appropriate levels in breast milk are vital for this first stage of life. The amino acids tryptophan, arginine, glutamate, and taurine, for example, are suggested to have a positive effect on immune functions. The purpose of the present study was to develop a new method for the assay of amino acids in human milk by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) after hydrolysis. Breast milk samples were collected from 77 healthy mothers living in the community of Extremadura (Spain) with less than 2 months of lactation. The samples were then stored at -80°C . The

HPLC-ESI-MS/MS technique proved to be a sensitive and efficient tool for the assay of amino acids in breast milk. The method could be used for the qualitative screening of 40 underivatized amino acids, and for the assay of 20. The resulting data will serve to improve commercial infant formula milks and bring them closer to the reference standard represented by human milk.

Keywords Amino acids · Tandem mass spectrometry · Screening · Human milk · Lactation · Breast feeding

Introduction

Human milk is the nonpareil food for the first 6 months of life. It is characterized by a large number of nutrients which cover all the newborn's requirements (World Health Organization 1985). These nutrients include amino acids, which form part of the nitrogen fraction of human milk and play a key role in the infant's development given the immaturity of its enzyme systems and metabolism (Gil 2005). Amino acids are molecules with an amino and a carboxyl group separated by an organic group $-\text{CHR}$ where R is unique to each amino acid (Liu et al. 2002). Free amino acids serve as signaling molecules (Greengard 2001) and have antioxidant and buffer properties (Kang et al. 2002). Since they are involved in the metabolism of many diseases, including neurodegenerative disorders, their assay in biological fluids can provide essential information about different pathologies.

Proteolysis in the gut generates free amino acids that are absorbed by the jejunum and then released into the bloodstream. They enter the liver and other tissues from the plasma pool for the synthesis of plasma and intracellular proteins. Also, the reactions of transamination and deamination of the different amino acids generate energy and produce secondary

C. L. Sánchez López · L. Franco · A. B. Rodríguez · C. Barriga
Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Group,
Faculty of Science, University of Extremadura,
Badajoz, Spain

J. Cubero
Didactic Area in Experimental Science, Faculty of Education,
University of Extremadura,
Badajoz, Spain

J. Sánchez
Laboratory of Metabolopathies,
"Perpetuo Socorro" Hospital (S.E.S.),
Badajoz, Spain

M. Rivero
R+D+i Department, Ordesa Group,
Barcelona, Spain

C. L. Sánchez López (✉)
Department of Physiology, Faculty of Science,
University of Extremadura,
Av. Elvas s/n,
06006 Badajoz, Spain
e-mail: crissanchez@unex.es

metabolites (Bixel et al. 2001). Of particular importance is the key role of amino acids in nerve signal transmission in which they act as neurotransmitters or their precursors. The main excitatory primary amino acid is glutamic acid (glutamate), while glycine is the main inhibitory amino acid. Glutamate is stored in vesicles in chemical synapses in the CNS. Nerve impulses release it from pre-synaptic cells to its receptors in post-synaptic cells, with it being involved in cognition, learning, and memory in the brain (long-term potentiation). Its excitotoxicity occurs as part of an ischemic cascade, it being associated with such disorders as autism, amyotrophic lateral sclerosis, and some forms of mental retardation and Alzheimer's disease (Shen et al. 2010). Glycine, a nonessential amino acid as it can be synthesized from serine, is a potent inhibitory neurotransmitter in the CNS, found mostly in the spinal cord and retina (Shimazaki et al. 2010). Tyrosine is converted to catecholamines via a prior transformation into L-dopa, with a consequent excitatory action in the CNS (Pencharz et al. 2007). Taurine is an amino acid that is essential for the development of the newborn brain. It acts as a neurotransmitter and has positive effects on the modulation of the visual, auditory, and intellectual capacities, while acting as an antioxidant and increasing the strength of the heart muscle. In addition, its conjugation with bile acids facilitates the infant's response to colic (Gaul 1989; Rivero Urgell et al. 2005). Histidine is the precursor of the neurotransmitter histamine which regulates hormonal functions, sleep, food intake, thermoregulation, and locomotor activity, *inter alia* (Panula et al. 2000). Tryptophan, an essential amino acid, is the precursor of the neurotransmitter serotonin, the hormone melatonin, and the vitamin niacin (B₃), and is of prime importance for the adjustment of the sleep/wake circadian rhythms and for the prevention of diarrhea syndromes (Cubero et al. 2006, 2009).

The aim of the present study was to assay the principal amino acid composition of human milk, in particular the amino acids actively involved in the development of the infant's digestive and nervous systems, using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The study was optimized with the aim of replacing the reference method of ion-exchange chromatographic post-column ninhydrin derivatization which is two orders of magnitude more time consuming (2 h per sample vs. 2 min per sample in the present screening method).

Materials and Method

Principle of the Assay

Following deproteinization and the subsequent extraction of the amino acids of human milk (together with their stable

isotope-labeled internal standards), these can then be separated by high-performance liquid chromatography (HPLC) and passed to a mass spectrometer. The result of electrospray ionization is the formation of electrically charged molecules. These are separated according to their mass/charge (m/z) ratio in the first quadrupole, then fragmented in the collision cell (second quadrupole) with argon gas. The fragments of the molecule that are characteristic of each amino acid are selected in the third quadrupole. This process is known as multiple reaction monitoring.

Biological Samples

Samples of breast milk of healthy lactating women ($n=77$) were collected from January to December 2008, in polystyrene tubes before each feed over a 24-h period (a total of 540 samples: 135 colostrum milk, 180 transitional milk, and 225 mature milk), and stored frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis in duplicate. In general, between six and eight samples of breast milk were obtained from each mother. The analytical method used required a minimal volume of only 1 mL.

Reagents and Chemicals

All reagents and chemicals were of the highest purity available or HPLC grade. The following were the reagents and chemicals required: standard amino acids for hydrolyzed analysis from Beckman Coulter© (Madrid, Spain); stable isotope-labeled amino acids (AA*, see Table 1) from the PerkinElmer (Turku, Finland) underivatized amino acid and acylcarnitine commercial kit, except for DL-aspartic acid (2,3,3-D3*), DL-glutamic acid (2,4,4-D3*), L-tryptophan (Indol D5*), and taurine (1,2-¹³C2*) from Cambridge Isotope Laboratories (CIL©, Andover, MA, USA).

Amino Acid Extraction

Prior to determining the amino acid content of a protein, these components must be released from their protein-bound form. In the present case of human milk amino acids, these were hydrolyzed by the technique of Yamawaki et al. (Yamawaki et al. 2005), with certain modifications. Aliquots of 1 mL of each human milk sample were de-fatted with 0.5 mL of diethyl ether (Sigma-Aldrich©). The supernatants were collected, discarding the fatty halo. The samples were then hydrolyzed with 1 mL of 6 N HCl (Sigma-Aldrich) for most of the amino acids, and 0.75 g of BaOH (Sigma-Aldrich) and 1.75 mL of Milli-Q water for tryptophan. Aliquots were mixed gently and allowed to stand for 22 h at $110\text{ }^{\circ}\text{C}$. They were then filtered through a

Table 1 List of the amino acids (AA) and stable isotope-labeled standards (AA*)

Amino acid	Abbreviation	Parent monitored transition (m/z)	Daughter monitored transition (m/z)	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Alanine	ALA	90.00	44.00	0.050	16.0	6.0
Alanine*	ALA*	94.00	48.00	0.050	16.0	9.0
Arginine	ARG	175.2	70.10	0.050	20.0	18.0
Arginine*	ARG*	180.2	75.10	0.050	20.0	18.0
Aspartic acid	ASP	134.1	88.1	0.050	16.0	11.0
Aspartic acid*	ASP*	135.2	89.1	0.050	16.0	11.0
Citrulline	CIT	176.2	113.1	0.050	15.0	14.0
Citrulline*	CIT*	178.1	115.1	0.050	15.0	14.0
Glutamic acid	GLU	148.1	102.1	0.050	16.0	11.0
Glutamic acid*	GLU*	150.1	104.1	0.050	15.0	10.0
Glycine	GLY	76.0	30.0	0.050	16.0	6.0
Glycine*	GLY*	78.0	32.0	0.050	16.0	8.0
Histidine ^a	HIS	156.2	110.1	0.050	15.0	10.0
Leucine	LEU	132.2	86.1	0.050	16.0	12.0
Leucine*	LEU*	135.2	89.1	0.050	16.0	11.0
Methionine	MET	150.2	104.1	0.050	15.0	10.0
Methionine*	MET*	153.2	107.1	0.050	15.0	10.0
Ornithine	ORN	133.2	70.1	0.050	18.0	15.0
Ornithine*	ORN*	139.2	76.1	0.050	18.0	15.0
Phenylalanine	PHE	166.2	120.1	0.050	16.0	12.0
Phenylalanine*	PHE*	172.2	126.1	0.050	16.0	12.0
Proline	PRO	116.1	70.1	0.050	9.0	12.0
Proline*	PRO*	121.1	75.1	0.050	10.0	12.0
Serine ^a	SER	106.1	60.1	0.050	16.0	12.0
Taurine	TAU	261.2	135.1	0.050	24.0	22.0
Taurine*	TAU*	263.2	137.1	0.050	24.0	22.0
Tryptophan	TRP	188.2	142.1	0.050	16.0	12.0
Tryptophan*	TRP*	193.2	147.1	0.050	16.0	12.0
Tyrosine	TYR	182.2	136.1	0.050	16.0	12.0
Tyrosine*	TYR*	188.2	142.1	0.050	16.0	12.0
Valine	VAL	118.1	72.1	0.050	16.0	12.0
Valine*	VAL*	126.1	80.1	0.050	16.0	12.0

The corresponding specific transitions used for their identification in MS/MS positive ionization mode are given together with their specific cone voltage (in V) and collision energy (in eV)

^aHistidine and serine are compared with methionine* and valine*, respectively

0.45- μ m membrane filter (Millex[®], Millipore, USA), and the filtrate was used for assay.

Tandem Mass Spectrometry

The samples were analyzed using a Waters 2795 Alliance HT HPLC[®] (Milan, Italy) coupled to a Micromass Quattro Ultima mass spectrometer (Milan, Italy) with an electrospray ionization source. The mass spectrometer data were acquired and analyzed using the MassLynx MS software

platform (Waters[®]), and the results were calculated using the NeoLynx[®] software package (Waters[®]). Table 1 presents the specific transitions used in positive ion mode to screen for each amino acid. The parameters used were: source temperature, 350 °C; desolvation gas flow rate, 650 L/h; cone gas flow rate, 650 L/h at 55 V; capillary voltage, 3.50 kV; dwell time, 50 ms; and delay time between each mass transition, 5 ms. The measurements of each transition and of the total ion current were made using a MassLynx MS (Waters).

Table 2 Linearity, sensitivity, reproducibility, and recovery ranges of the amino acids of the commercial kit evaluated

Amino acids	Linearity, upper (μM)	Sensitivity (μM)	Reproducibility (%)	Recovery (%)
Alanine	4,090	4.5	8	91
Arginine	3,720	0.6	7.5	86
Citrulline	1,680	4.8	9.1	95
Glycine	4,480	50.4	9.1	92
Leucine	2,540	1.3	7.7	91
Methionine	1,180	2.5	7.9	86
Ornithine	3,770	0.6	7.6	89
Phenylalanine	2,340	0.3	8.2	94
Proline	3,650	4.7	7.1	92
Tyrosine	2,810	1.2	8.1	95
Valine	2,350	0.6	8.4	87

Liquid Chromatography

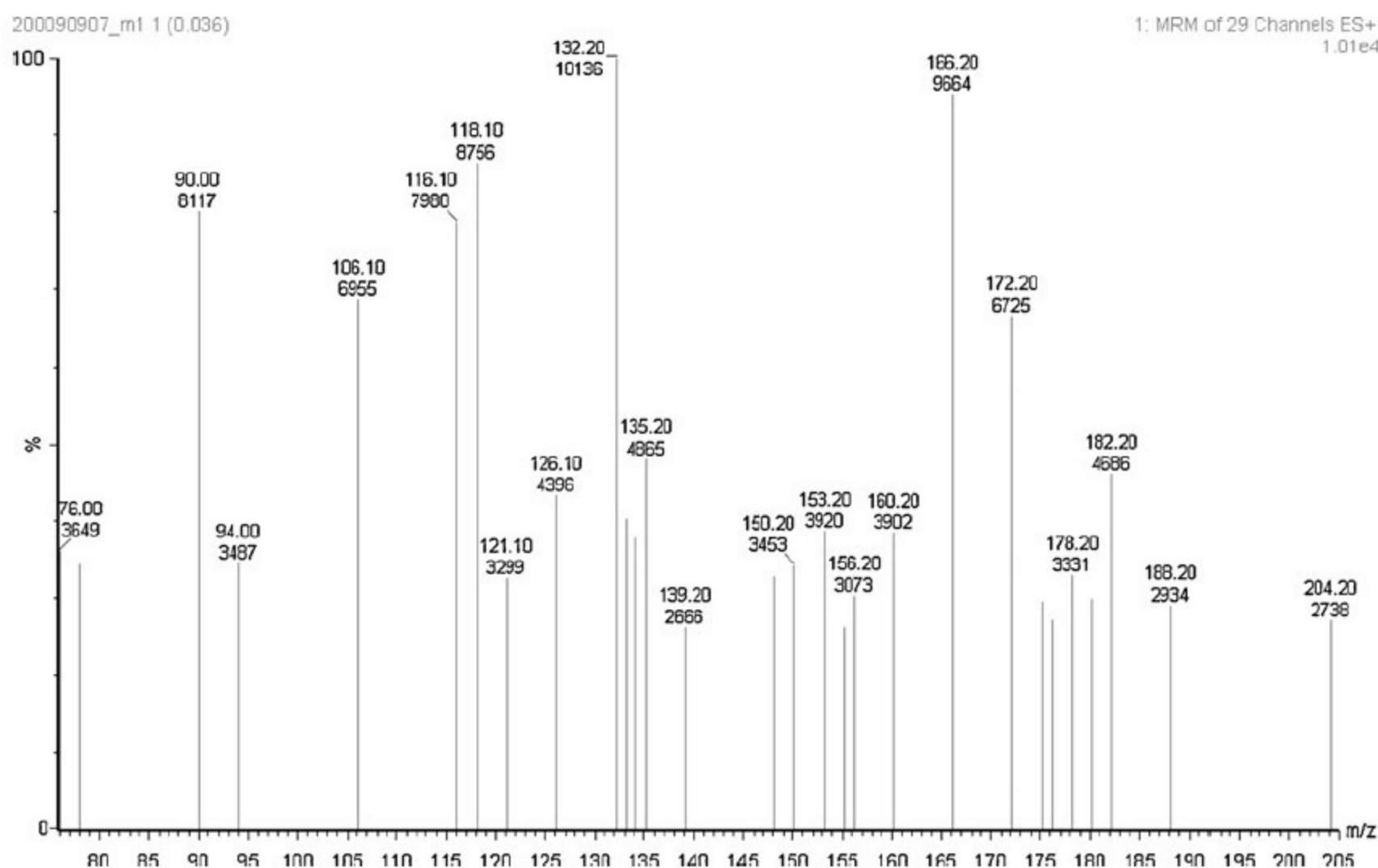
Following the literature descriptions of the successful use of reagents for ion-pairing in the separation of many amino acids (Chaimbault et al. 1999; Petritis et al. 2000, 2002), we prepared the eluent by adding 250 mL of nanopure water (resistivity, 18 M Ω cm) to 750 mL HPLC-grade methanol (Merck©) and 0.01% formic acid (Merck©). The mobile phase flow rate was 120 $\mu\text{L}/\text{min}$, and the sample volume injected was 20 μL .

The use of stable isotope-labeled amino acids as internal standards corrects for the ion suppression phenomenon, assuming that there is the same signal modification for the analyte and its internal standard.

Linearity, Sensitivity, Reproducibility, and Recovery of the Assay Technique

The commercial kit's linearity was determined by performing a linear regression analysis of the measured amino acid concentrations as a function of the corresponding known spiking levels.

Functional sensitivity was determined by extracting dried samples of breast milk with known concentrations of amino acids. The extraction was performed by leaching with a solution of 75% methanol, 25% Milli-Q water, and 0.01% formic acid for 2 h at 45 °C. The sample was then cooled to -20 °C for 5 min to avoid evaporation, and the supernatant was transferred to a 96-well truncated V-bottomed microtiter plate.

**Fig. 1** Mass spectrum of all the analytes and patterns studied

The reproducibility (precision) was determined in accordance with the National Committee for Clinical Laboratory Standardization guidelines. It consisted of two assays per day for 20 days over a period of 1 month, using the same batch of material including the extraction solution and flow solvent, and following the commercial kit's procedure. The two daily assays were separated by at least 4 h. All assays were performed with the same tandem mass spectrometer.

The recovery of the extraction process was determined using spiked samples and applying the following equation:

$$\text{Recovery} = \frac{[\text{Measured amount} - \text{Measured endogenous amount}]}{\text{Added amount}}$$

Results

Although first introduced over 40 years ago, the dried blood spot (DBS) technique has recently gained heightened interest for its potential advantages in the collection and bioanalysis of small blood samples. We here applied the technique to the determination of amino acids in human milk samples. The procedure consisted of collecting and spotting a human milk specimen pre-hydrolyzed by hydrochloric acid (except for tryptophan which was subjected to basic hydrolysis) onto specially prepared paper cards. The sample is diluted 1:30 times, and allowed to air dry, thus

facilitating the analysis by allowing the card to be handled with no special precautions.

The samples were assayed during the first 3 days, and after 1 week and 15 days of arrival at the laboratory. The advantage of this method is that, after initial evaporation, the same sample can be redissolved with the eluent, avoiding the problem of evaporation affecting the concentration measured in the sample. We found variations in the results for histidine, serine, and glycine, although this last in smaller amounts. The advantages of the DBS technique include ease of use, the small sample volumes required, reduced sample shipping and storage costs, and chemical testing. The present feasibility study was undertaken to evaluate DBS as an alternative to traditional liquid milk assays, and to compare DBS and its stability.

The absolute limit of detection for the MS detector was defined as three times the signal-to-noise ratio of each AA solution dried spot.

The linearity, sensitivity, reproducibility (precision), and recovery of the method were determined by assaying breast milk samples dried on filter paper and spiked with known increased concentrations of amino acids (Table 2).

After completion of the trials performed to optimize the analytical method, all the breast milk samples ($n=540$) of the nursing mothers ($n=77$) were assayed in duplicate. Figure 1 shows the mass spectrum of all the analytes and pattern studies. Table 3 lists the concentrations of each amino acid determined for each stage of lactation.

Table 3 Mean and standard deviation of the concentrations of all the breast milk amino acids analyzed for each mother ($n=77$) over a 24 h period

Amino acids (mg/dL)	Colostrals milk		Transitional milk		Mature milk	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Alanine	56.83	11.06	47.55	10.38	40.17	8.56
Arginine	53.75	11.87	40.14	9.45	38.01	10.82
Aspartic acid	99.31	20.46	84.35	16.57	90.20	19.51
Citrulline	4.32	2.24	3.65	2.45	6.09	2.07
Glutamic acid	222.63	41.81	177.19	36.36	151.73	24.71
Glycine	31.24	8.71	26.26	7.23	26.26	4.34
Histidine	26.39	6.18	26.35	5.90	23.78	3.68
Leucine	96.98	21.56	68.03	13.89	67.10	12.22
Methionine	29.55	11.96	40.22	10.90	15.77	3.81
Ornithine	7.41	3.14	7.42	4.58	8.97	2.87
Phenylalanine	45.94	9.56	37.29	7.66	35.64	7.98
Proline	114.79	23.47	92.71	19.42	79.24	17.41
Serine	54.38	11.06	54.26	12.19	45.61	11.21
Taurine	72.14	11.58	73.64	16.49	64.28	1.88
Tryptophan	34.69	0.35	26.53	0.41	15.07	0.20
Tyrosine	41.81	8.85	31.95	6.65	32.48	6.24
Valine	60.40	13.10	49.51	10.52	54.07	10.25

Units are in milligrams per deciliter

Discussion

Human milk is the nonpareil food during the first 6 months of an infant's life. It is characterized by a large number of nutrients which cover all the newborn's requirements and play a key role in its development given the immaturity of its enzyme systems and metabolism.

Amino acids in food exist in a free form or bound in peptides, proteins, and non-peptide bonded polymers. The determination of the total amino acid content of foods requires the proteins to be hydrolyzed by different means that take into account variations in stability of the individual amino acids and the resistance of different peptide bonds to the hydrolysis procedure. Because of this, we followed the indications given by Darragh in 2005 (Darragh and Moughan 2005), who showed that there was a clear effect of hydrolysis time on the determination of amino acids in a sample.

Due to the large number of samples, the method of the present study was optimized with the aim of replacing the reference method of ion-exchange chromatographic post-column ninhydrin derivatization which is two orders of magnitude more time consuming (2 h per sample vs. 2 min per sample in the present screening method). Thus, while other methods have many problems such as baseline disturbances due to ammonia (Moore and Stein 1963; Pan and Stein 1963; Smith 2003), multiderivative basic amino acid and tyrosine forms (Woo and Ahan 1996), multiple product formation (McClung and Frankenberger 1988), and undetected amino acids (Erbe and Brückner 2000; Bazzanella et al. 1998; Latorre et al. 2002; Izco et al. 2002), the present tandem mass spectrometric method of breast milk amino acid assay proved to be fast, effective, economic, and efficient. However, the main difficulties that we encountered were isobaric interferences which only allowed the principal amino acids to be detected, a major lability of histidine (2–3 days at most), and some problems with serine and methionine binding to the microtiter plate, thus leading to some anomalous results.

The content of breast milk not only varies over the course of lactation, but also during the day and even within a given feed (Sánchez et al. 2008a), depending on the infant's requirements. Thus, the results of the present study represent average values of concentrations conforming to the amino acid profile in breast milk samples from a population of women in the autonomous community of Extremadura, who attended daily the neonate service of the Hospital "Perpetuo Socorro."

It has to be noted that some of these women did not follow a diet that was appropriate for their current physiological stage (Sánchez et al. 2008b). This was reflected in the variability of the different samples. The results are nevertheless close to those reported by other

workers for populations of women of different nationalities and races (Yamawaki et al. 2005).

We thus propose this analytical method, with its use of a precise and optimal technology for the detection of analytes, as considerably reducing both assay time and the volumes of sample and reagents required. It improves the sensitivity of the assay of amino acids in foods and the resolution for their identification, in comparison with other chromatographic methods such as ion-exchange chromatography, HPLC, gas chromatography, and capillary electrophoresis (Peace and Gilani 2005). The results were found to be acceptable for the purpose of screening, with the method being very fast and hence applicable to large numbers of samples, for example, to the massive analysis of samples of a milk bank.

Acknowledgments We are grateful to the mothers who volunteered to patiently extract their breast milk during the 24-h period. This research was supported financially by the Ordesa Group and the University of Extremadura through the grant "II Plan de Iniciación a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación," awarded to Cristina L. Sánchez López. We are also grateful to Ms. Elena Circujano for her technical help and to all the medical staff of the hospital for their kind and continuous assistance during the sampling period.

References

- Bazzanella A, Lochmann H, Tomos AD, Bachmann K (1998) *J Chromatogr A* 809:231
- Bixel M, Shimomura Y, Hutson S, Hamprecht B (2001) *J Histochem Cytochem* 49:407
- Chaimbault P, Petritis K, Elfakir C, Dreux M (1999) *J Chromatogr A* 855:191
- Cubero J, Narciso D, Aparicio S et al (2006) *Neuro Endocrinol Lett* 27:373
- Cubero J, Chancón B, Sánchez S, Rivero M, Rodríguez AB, Barriga C (2009) *Nutr Neurosci* 12:272
- Darragh AJ, Moughan PJ (2005) *AOAC Int* 88:888
- Erbe T, Brückner H (2000) *J Chromatogr A* 881:81
- Gaull GE (1989) *Pediatrics* 83:433
- Gil A (ed) (2005) *Tratado de Nutrición*. Acción Médica, Madrid
- Greengard P (2001) *Biosci Rep* 21:247
- Izco JM, Tormo M, Jiménez-Flores R (2002) *J Dairy Sci* 85:2122
- Kang KW, Choi SH, Kim SG (2002) *Nitric Oxide* 7:244–253
- Latorre RM, Saurina J, Hernández-Cassou S (2002) *J Chromatogr A* 976:55
- Liu L, Iwata K, Yohda M, Miki K (2002) *FEBS Lett* 528:114
- McClung G, Frankenberger WT (1988) *J Liq Chromatogr* 11:613
- Moore S, Stein WH (1963) *Methods Enzymol* 6:819
- Pan YE, Stein WH (1963) In: Shiverly JE (ed) *Methods of protein microcharacterization*. Humana Press Inc, Clifton, pp 105–119
- Panula P, Karlstedt K, Sallmen T et al (2000) *J Chem Neuroanat* 18:65
- Peace RW, Gilani GS (2005) *AOAC Int* 88:877
- Pencharz PB, Hsu JW, Ball RO (2007) *J Nutr* 137:1576S
- Petritis K, Chaimbault P, Elfakir C, Dreux M (2000) *J Chromatogr A* 896:253
- Petritis K, Elfakir C, Dreux M (2002) *J Chromatogr A* 961:9
- Rivero Urgell M, Santamaría Orleans A, Rodríguez-Palmero Seuma M (2005) *Nutr Hosp* 20:135

- Sánchez CL, Cubero J, Sánchez J, Chancón B, Rivero M, Rodríguez AB, Barriga C (2008a) *Nutr Neurosci* 12:2
- Sánchez CL, Rodríguez AB, Sánchez J, González R, Rivero M, Barriga C, Cubero J (2008b) *Arch Latinoam Nutr* 58:371
- Shen H, Kihara T, Hongo H et al (2010) *Br J Pharmacol* 161:127
- Shimazaki T, Kaku A, Chaki S (2010) *Psychopharmacology (Berl)* 209:263
- Smith AJ (2003) *Methods Mol Biol* 211:133
- Woo KL, Ahan YK (1996) *J Chromatogr A* 740:41
- World Health Organization (1985) Energy and protein requirements. Technical report series no. 724. WHO, Geneva, p 20
- Yamawaki N, Yamada M, Kan-no T, Kojima T, Kaneko T, Yonekubo A (2005) *J Trace Elem Med Biol* 19:171

Evolution of the circadian profile of human milk amino acids during breastfeeding

Sánchez CL^{a*}, Cubero J^b, Sánchez J^c, Franco L^a, Rodríguez AB^a, Rivero M^d, Barriga C^a

^a Chrononutrition Lab, Dept. of Physiology, Fac. of Science. University of Extremadura, Spain.

^b Didactic Area in Experimental Science, Fac. of Education, University of Extremadura, Spain.

^c Metabolism Lab, Perpetuo Socorro Hospital, Servicio Extremeño de Salud (SES), Badajoz, Spain.

^d Scientific Division Manager, Ordesa Group, Barcelona, Spain.

Word count: 3055

Number of tables: 4.

Corresponding author:

Cristina L. Sánchez López

Dept. of Physiology, Fac. of Science, University of Extremadura.

Av. Elvas s/n 06006 Badajoz, Spain.

Tel. & fax: + 34 924 289 388

crissanchez@unex.es

ABSTRACT

Human milk is a living fluid that changes with time, with its composition and volume. Humans' physiological functions are under circadian control, and one of the more patent rhythms in our lives is the sleep-wake cycle. Our aim was to study the circadian rhythm of the breast milk's amino acids and their evolution throughout the breastfeeding period. 77 women collected samples every three hours of their breast milk over a 24-h period. The rhythmicity of the amino acids was determined by cosinor analysis. No circadian rhythm was found in the secretion of most amino acids, the exception being tryptophan at colostrum, and tryptophan and methionine at transition phase, possibly because the newborn has regulated its pattern of intake to every 3 hours regardless of whether it is day or night. By the last stage (mature milk), when the milk has fully stabilized, most of the amino acids presented circadian rhythms. It is concluded that breast milk should be given to the baby at the same time of day it is expressed. Thus, the baby would be adjusting his circadian pattern in harmony with his environment (day/night), crucial for the proper functioning and synchronization of all systems in the human body.

Keywords: amino acids, sleep, circadian rhythm, human milk, analysis, tandem mass.

INTRODUCTION

Breast milk and breastfeeding have to be considered as the referent or "gold standard" of infant feeding during the first six months of life (¹). Breast milk is not a static biological fluid but, on the contrary, is a dynamic fluid that changes not only over the course of the period of lactation, but also during the day, and even during the same session of nursing, and can be influenced by the mother's own diet (^{2,3}).

The temporal variation in its composition (inter- and intra-individual) has been extensively studied. The principal focus has been on its lipid profile (^{4,5}) and its protein and amino acid content (⁶⁻¹⁰).

The first analyses of the changing composition of breast milk during the day were performed to determine, within the variability of the milk itself, the most appropriate time of day to take the value of the analyte as the reference value.

Previous studies have found the protein content of breast milk to be greatest in the colostrum period, and to decline over the transition period to a lower level in the mature milk, in keeping with the physiological demand of the newborn. But far more rapid changes in this content have also been observed – in particular, circadian variations with higher concentrations during daylight hours than during the night (¹¹). Other workers have also reported such circadian variations in different components of breast milk, with values that differ between day and night. This is the case for the minerals calcium and magnesium, and the trace elements zinc (¹²), copper, and iron (¹³), and for some micronutrients such as lactose which has minimum values at 17:00 h (¹⁴), and the essential amino acid tryptophan which has a nocturnal acrophase (¹⁵). All these are of vital importance for the optimal growth of the newborn.

The regulation of the sleep/wake cycle is complex, and involves many neurochemical transmission systems. Those of acetylcholine, dopamine, norepinephrine, serotonin, histamine,

hypocretin, and orexin act to maintain states of activity (¹⁶), i.e., they are promoters of wakefulness (¹⁷). The concentration of these neurotransmitters will be higher during daylight mainly in the brain stem and hypothalamic region, and the variation may be reflected in peripheral fluids such as breast milk. Other neurotransmitters such as GABA and serotonin exert their neuromodulatory action on sleep (¹⁸). In particular, these two molecules act in regions of the hippocampus and the raphe nucleus, respectively, and their maximum neuroactivity occurs during the night.

This neural modulation is thought possibly to be present in breast milk, thereby influencing the newborn's sleep/wake rhythm through precursor amino acids whose levels may vary throughout the day depending on whether the infant is asleep or active.

In this context, the goal of this study was to analyze the circadian rhythm of some of the components of breast milk. In particular, these were substances well known to be important in regulating the circadian sleep-wakefulness rhythm and to affect the immune system – tryptophan, and the neuroactive amino acids methionine, tyrosine, phenylalanine, glutamic acid, glycine, aspartic acid, taurine, and histidine.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The participants were 77 breastfeeding women (32 ± 5 years old, 70.8 ± 11.6 kg, 1.65 ± 0.06 m, and BMI 26.1 ± 4.3 kg/m²). These women were recruited from the Perpetuo Socorro Hospital (Servicio Extremeño de Salud, S.E.S.). During the study, the subjects took no drugs that could affect their amino acid levels. The mothers were informed of the methods of the study and all of them signed an informed consent form to participate. The Ethical Investigation Committee of University of Extremadura approved the study.

Samples

Samples of breast milk were collected in polystyrene tubes before each feed over a 24-h

period. In general, between 6 and 8 samples of human milk were obtained from each mother. The collection campaign lasted from January to December 2008. The samples were stored frozen at -80°C until assay in duplicate.

Extraction of the amino acids

The technique of Yamawaki (⁹) was followed with certain modifications. Aliquots of 1 ml of each sample were de-fatted with 0.5ml of diethyl ether (Sigma-Aldrich). The supernatants were collected, discarding the fatty halo, followed by hydrolysis with 1 ml of 6N HCl (Sigma-Aldrich) for most of amino acids, and 0.75g of BaOH (Sigma Aldrich) and 1.75ml of MilliQ water for tryptophan (¹⁹). After gentle mixing, the aliquots were allowed to stand for 22 hours at 110°C, and then filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millex, Millipore, USA) to remove the ash before assay.

HPLC-ESI-MS/MS analysis

The samples were assayed using a Waters 2795 Alliance HT HPLC (Milan, Italy) coupled to a Micromass Quattro Ultima mass spectrometer (Milan, Italy) with an ESI (Electrospray Ionization) source, together with an Agilent Zorbax Eclipse AAA C18 column (3.0 mm × 150 mm × 3.5 micron) for the amino acid analyses. The liquid chromatography–tandem mass conditions were as follows: column temperature 80°C; source temperature 80°C; desolvation gas flow 650 L/h; cone gas and voltage 0 L/h and 55 V, respectively; and capillary voltage 3.50 kV.

Chronobiological analysis

The chronobiological analysis of the data was performed using the Ritme[®] for Windows software package. The rhythmicity of each amino acid was studied by cosinor analysis (²⁰). The sinusoidal function used for the fit was:

$$y(t) = M + A \times \cos [(2 \times \pi/\tau) \times t - \Phi]$$

where $y(t)$ is the value of the cosine function at time t , M is the mean level of oscillation or MESOR (acronym for Midline-Estimating Statistic Of Rhythm, the mean value about which the oscillation occurs equal to the arithmetic mean of equidistant data covering a whole number of cycles), A is the amplitude (measure of the extent of a rhythmic change in a cycle as estimated by the sinusoidal function that best fits the data), the angular frequency is $\omega = 2 \times \pi/\tau$ where π is the number pi and τ is the period (24 hours in our case), and Φ is the acrophase (a phase angle measuring the timing of the peak activity, expressed as the lag from a reference time to the crest time of the best fit sinusoidal function). A cosinor analysis thus finds the best-fitting sinusoidal function by estimating three parameters: mesor, amplitude, and acrophase.

With the cosinor analysis, we determined the 95% confidence intervals of the MESOR, amplitude, and acrophase. When this interval contains the value 0, one possibility that amplitude is 0 can not be rejected, so that the existence of a rhythm is not statistically significant. This is equivalent to testing whether the null hypothesis of zero amplitude is rejected at an alpha level of 0.05. The statistical significance of the fit of the cosine curve to the data is indicated by the P-value.

The confidence intervals of the acrophase show whether there are significant differences between the acrophases of different variables. In particular, if two confidence intervals overlap, the possibility that the two acrophases are equal can not be discarded.

RESULTS

These results are similar to those obtained by other authors (⁹).

Colostrum stage (<5 days post-partum)

Table 1 gives the mean concentrations of each amino acid in mg/dL during the colostrum period. To facilitate the comprehension of the data, the table is presented in two parts: daytime (09:00 to 21:00, Table 1a) and night-time (21:00 to 09:00, Table 1b.)

One observes from the table how the amino acids vary during this stage of lactation

according to the time of day. However, a chronobiological analysis only revealed a circadian rhythm for the essential amino acid tryptophan (precursor of the neurotransmitter serotonin and the hormone melatonin), demonstrating the marked effect that this component of the milk start to have on the infant from its first feed after birth.

Transitional stage (6-15 days post-partum)

Table 2 presents the daytime (a) and night-time (b) concentrations of the amino acids during the transition phase. The milk during this stage, as its name indicates, is characterized by having a composition intermediate between that of the colostrum and the mature stages. It occurs from days 6 to 15 of lactation.

One observes that, as was the case in the colostrum phase, the amino acid profile varies over the course of the day. In addition, the concentrations of most of the amino acids decline as nursing advances.

The chronobiological analysis again showed the amino acid tryptophan to continue to present a circadian rhythm with acrophase during the night (03:00 approx.). Now, however, the essential amino acid methionine also had a pronounced circadian rhythm, with acrophase during the daytime (18:00 approx.). The variations in concentrations at different times of day and the chronobiological data are given in Tables 2 and 4, respectively.

Mature stage (>15 days post-partum)

Table 3 presents the results of the assay of amino acids in the mature stage of breast milk, during daytime (Table 3a) and night-time (Table 3b). At this stage, most of the milk's components have stabilized for the remaining months of lactation.

The chronobiological analysis showed additional amino acids to now present a circadian rhythm. Table 4 lists the chronobiological parameters MESOR, amplitude, acrophase, and *P*-value of the amino acids which presented circadian rhythms in the different stages of lactation.

DISCUSSION

The aminogram values quantified in our tandem mass assays proved to be consistent with the corresponding values reported by other workers, in particular with those of Yamawaki et al. (9) who presented an extensive analysis of the macronutrients and micronutrients in breast milk.

All the neuroactive amino acids studied in the present work except aspartic acid and glycine are essential to the neonate stage (21), and, since their endogenous synthesis is non-existent, the infant has to obtain them from the milk. Neither must one forget that the main function of these nitrogenous components is protein anabolism, which is accelerated in the newborn whose structural demand is very high.

The novel contribution of the present work is the idea that the amino acids in breast milk change during the course of the day, with particular relevance being whether the acrophase occurs during the stage of sleep or of wakefulness, in consonance with their neural demand. In our view, the exact timing of the acrophase is of minor importance, since for this to be quantified with precision, it would be necessary to study a large population and with less temporal heterogeneity, i.e., taking all the milk extractions at the same time of day and season of the year, which was not feasible for us.

The presentation of the results began with the colostrum milk stage. The circadian rhythm of most of the components of the milk is almost absent at this stage, reflecting the still premature secretion of the milk, and because the infant's sleep/wakefulness equilibrium is yet to be entrained. Added to this is that the intervals between taking the breast are very short and constant. We only observed the beginning of a circadian rhythm for the essential amino acid tryptophan, which was confirmed in the subsequent stages.

For the transitional milk, added to tryptophan was another essential amino acid which presented a circadian rhythm – methionine, precursor of the neurotransmitter acetylcholine (22). Its

acrophase appears in opposition to tryptophan, i.e., during the day, coinciding with the stage of wakefulness and greater likelihood of activity in the infant.

Finally, it is in the mature stage where there unfold the circadian rhythms of the activity-promoting neuroactive amino acids: phenylalanine, an essential amino acid and, together with tyrosine, precursor of epinephrine and norepinephrine (^{17,23}), methionine, an essential amino acid and precursor of acetylcholine (^{22,24,25}), and aspartic acid and glycine, activity neurotransmitters and therefore with their acrophase during wakefulness⁷.

The histidine results were unexpected. As a precursor of histamine – an activity neurotransmitter (²⁶) – its acrophase is contradictory since it occurs during the period of darkness, i.e., when there is a greater tendency to sleep. A possible explanation is that this is a semi-essential amino acid at this stage of life, so that its endogenous levels may not be influenced by its intake with food (²¹).

Although the variations observed in our study were small, they can be significant in terms of neural response. The existence of the tryptophan circadian rhythm in all three stages of lactation (colostrum, transition, and mature) particularly stands out, being strong evidence for the possible action of this essential amino acid on the neurotransmitter serotonin and the hormone melatonin, both of which are sleep-inducing biogenic amines (^{27,28}).

We can summarize that breast milk is a dynamic biological fluid in that its composition is not constant, but evolves throughout the day and over the course of lactation, just as our diet evolves throughout the day and over the course of our lives (²¹).

One can thus argue again in defence of breastfeeding compared to artificial feeding because formula milks have a further handicap that has to be considered in that they do not possess the synchronization of the neuromodulatory amino acids that breast milk does. This temporal rhythm in the amino acids it supplies may offer the infant a physiological advantage in development,

including sleep, compared with artificial feeding in which the amino acid content is constant throughout the day.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the women who volunteered to patiently extract their breast milk during the 24-h period. This research was financial supported by Ordesa Group and the University of Extremadura for the grant “II Plan de Iniciación a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación”, awarded to Cristina L. Sánchez López. We are also grateful to Ms. Elena Circujano for her technical help and all the medical staff of the hospital for their kind and continuous assistance during the sampling period.

REFERENCES

1. World Health Organization. Energy and Protein Requirements. Technical Report Series No. 724. P20. Geneva: WHO. 1985.
2. Sánchez CL, Rodríguez AB, Sánchez J, González R, Rivero M, Barriga C, Cubero J. Calcium intake nutritional status in breastfeeding women. *Arch Latinoam Nutr.* 2008; 58:371-376.
3. Sánchez CL, Cubero J, Sánchez J, Chanclón B, Rivero M, Rodríguez AB, Barriga C. The possible role of human milk nucleotides as sleep inducers. *Nutr Neurosci.* 2009; 12:2-8.
4. Lubetzky R, Littner Y, Mimouni FB, Dollberg S, Mandel D. Circadian variations in fat content of expressed breast milk from mothers of preterm infants. *J Am Coll Nutr.* 2006; 25:151-154.
5. Lammi-Keefe CJ, Ferris AM, Jensen RG. Changes in human milk at 0600, 1000, 1400, 1800, and 2200 h. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1990; 11:83-88.
6. Clark RM, Ross SA, Hill DW, Ferris AM. Within-day variation of taurine and other nitrogen substances in human milk. *J Dairy Sci.* 1987; 70:776-780.
7. Shubat PJ, Parker D, Huxtable RJ. The effect of suckling and diurnal influences on the concentrations of free amino acids in milk. *Proc West Pharmacol Soc.* 1989; 32:73-78.
8. Catarru B, Boniglia C, Scalise F, Ambruzzi AM, Sanzini E. Nitrogenous components of human milk: non-protein nitrogen, true protein and free amino acids. *Food Chem.* 2003; 81:357-362.
9. Yamawaki N, Yamada M, Kan-no T, Kojima T. Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *J Trace Elem Med Biol.* 2005; 19:171-181.
10. Hernell O, Lodernall B. Nutritional evaluation of protein hydrolysate formulas in healthy term infants: plasma amino acids, hematology, and trace elements. *Am J Clin Nutr.* 2003; 97:224-233.
11. Sánchez CL, Hernández A, Rodríguez A B, Rivero M, Barriga C, Cubero J. Nitrogen and

- protein content analysis of human milk, diurnality vs. nocturnality. *Nutr Hosp.* 2011; 26(3):511:514.
12. Karra MV, Kirksey A. Variation in zinc, calcium, and magnesium concentrations of human milk within a 24-hour period from 1 to 6 months of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1988; 7:100–106.
 13. Picciano MF, Guthrie HA. Copper, iron, and zinc contents of mature human milk. *Am J Clin Nutr.* 1976; 29:242–254.
 14. Viverge D, Grimmonprez L, Cassanas G, Bardet L, Solere M. Diurnal variations and within the feed in lactose and oligosaccharides of human milk. *Ann Nutr Metab.* 1986; 30:196–209.
 15. Cubero J, Valero V, Sánchez J, Rivero M, Parvez H, Rodríguez AB, Barriga C. The circadian rhythm of tryptophan in breast milk affects the rhythms of 6-sulfatoxymelatonin and sleep in newborn. *Neuro Endocrinol Lett.* 2005; 26:657-661.
 16. Murillo-Rodríguez E, Arias-Carrión O, Sanguino-Rodríguez K, González-Arias M, Haro R. Mechanism of Sleep-Wake Cycle Modulation. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2009; 8:245-253.
 17. Hunsley M, Palmiter R. Altered sleep latency and arousal regulation in mice lacking norepinephrine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004; 78:765-773.
 18. Reis HJ, Guatimosim C, Paquet M, Santos M, Ribeiro F M, Kummer A, Schenatto G, Salgado J V, Vieira LB, Teixeira A L, Palotás A. Neuro-transmitters in the central nervous system & their implication in learning and memory processes. *Curr Med Chem.* 2009; 16:796-840.
 19. Cubero J, Valero V, Sánchez J, Rivero M, Parvez H, Rodríguez AB, Barriga C. The circadian rhythm of tryptophan in breast milk affects the rhythms of 6-sulfatoxymelatonin and sleep in newborn. *Neuro Endocrinol Lett.* 2005; 26:657-661.
 20. Halberg S, Tong YL, Johnston EA. Cellular aspects from biorhythms. Springer. New York. 1967.

21. Ballabriga A, Carrascosa A. *Nutrición en la infancia y adolescencia*, Ergon S.A. Madrid. 2001.
22. Sánchez CL, Barriga C, Rodríguez AB, Franco L, Rivero M, Cubero J. Effects of oral administration of L-methionine on activity/rest rhythm. *Acta Physiol Hung*. 2010; 97:224-233.
23. Mitchell HA, Weinschenker D. Good night and good luck: Norepinephrine in sleep pharmacology. *Biochem Pharmacol*. 2010; 79:801-809.
24. Sugimoto J, Tamino K, Kadokawa C, Iida N, Morita M. L-methionine as a modulator of atrial rhythmicity in rabbit and guinea-pig. *Jpn J Pharmacol*. 1964; 14:150-160.
25. Chabannes B, Sarda N, Cronenberger L, Pacheco H. Diurnal variations of S-adenosyl-L-methionine and adenosine content in the rat pineal gland. *Life Sci*. 1984; 35:589-596.
26. Monti J. Involvement of histamine in the control of the waking state. *Life Sci* 1993; 53:1331-1338.
27. Hajak G, Huether G, Blanke J, Blömer M, Freyer C, Poeggeler B, Reimer A, Rodenbeck A, Schulz-Variszegi M, Rütger E. The influence of intravenous L-tryptophan on plasma melatonin and sleep in men. *Pharmacopsychiatry*. 1991; 24:17-20.
28. Heuther G, Hajak G, Reimer A, Poeggeler B, Blömer M, Rodenbeck A, Rütger E. The metabolic fate of infused L-tryptophan in men: possible clinical implications of the accumulation of circulating tryptophan and tryptophan metabolites. *Psychopharmacology*. 1992; 109:422-432.

TABLES

DAY (mg/dL)	9:00h	12:00h	15:00h	18:00h	\bar{X} total DAY	SD DAY
Alanine	63.92	58.83	78.40	61.45	55.93	10.39
Arginine	58.77	54.88	73.68	58.04	53.33	10.27
Aspartic Acid	111.52	105.26	130.55	109.28	97.75	18.32
Citrulline	3.72	3.98	5.05	4.20°	4.36	2.49
Glutamic acid	228.41	219.73	271.05	232.80	222.38	36.76
Glycine	34.33	33.24	42.67	33.60	31.02	7.70
Hystidine	28.64	27.24	34.53	29.32	25.95	6.00
Leucine	97.26	92.60	122.98	102.08	96.95	18.21
Methionine	30.62	24.51	36.49	31.31	30.04	12.55
Ornithine	6.51	6.04	7.69	6.91	7.48	2.95
Phenylalanine	50.04	46.76	61.94	50.08	45.33	8.47
Proline	123.14	113.19	143.84	119.82	114.46	21.72
Serine	59.93	56.35	69.94	59.92	53.40	10.50
Tryptophan	34.74	34.69	34.52	34.61	34.64	0.37
Tyrosine	45.00	42.02	55.47	45.56	41.37	7.79
Valine	61.14	57.92	77.87	64.85	60.37	12.20
Taurine	73.66	69.93	67.65	72.15	71.81	11.90

Table 1a. Concentrations of amino acids (mean \pm SD) during the colostral stage at the specific hours of daytime (09:00–18:00) at which samples were taken (n = 31).

NIGHT (mg/dL)	21:00h	24:00h	3:00h	6:00h	\bar{X} total NIGHT	SD NIGHT
Alanine	59.25	61.62	50.39	59.67	57.73	11.72
Arginine	54.49	56.37	39.20	66.61	54.17	13.46
Aspartic Acid	102.44	108.61	76.08	116.32	100.86	22.59
Citrulline	3.80	4.53	3.38	5.41	4.28	1.98
Glutamic acid	210.46	236.81	194.43	249.83	222.88	46.86
Glycine	32.05	32.14	22.02	39.58	31.45	9.72
Hystidine	27.76	28.54	20.27	30.74	26.83	6.35
Leucine	92.48	101.69	87.18	106.68	97.01	24.91
Methionine	27.56	27.56	26.62	34.44	29.05	11.37
Ornithine	7.06	7.21	5.87	9.22	7.34	3.32
Phenylalanine	46.89	49.89	35.71	53.73	46.55	10.65
Proline	110.52	121.62	97.13	131.15	115.11	25.22
Serine	57.94	58.61	39.92	64.93	55.35	11.62
Tryptophan	34.62	34.81	34.76	34.79	34.74	0.33
Tyrosine	41.69	45.45	33.91	47.94	42.25	9.90
Valine	58.20	62.82	53.19	67.49	60.42	13.99
Taurine	71.52	75.39	72.27	70.69	72.46	11.25

Table 1b. Concentrations of amino acids (mean \pm SD) during the colostrals stage at the specific hours of night-time (21:00–06:00) at which samples were taken (n = 31).

DAY (mg/dL)	9:00h	12:00h	15:00h	18:00h	\bar{X} total DAY	SD DAY
Alanine	51.04	49.58	48.26	48.01	49.22	11.85
Arginine	44.83	41.01	40.53	39.40	41.44	10.65
Aspartic Acid	82.73	86.95	84.33	83.00	84.25	17.45
Citrulline	2.73	3.91	3.33	3.24	3.30	1.81
Glutamic acid	170.88	181.21	175.92	175.00	175.75	35.00
Glycine	30.50	27.16	27.68	26.56	27.97	8.93
Hystidine	32.23	26.44	26.13	25.43	27.56	6.45
Leucine	65.99	69.50	69.92	67.82	68.31	14.42
Methionine	36.68	43.25	44.57	42.34	41.71	11.68
Ornithine	8.26	8.17	8.43	7.57	8.11	5.70
Phenylalanine	36.73	38.25	38.68	36.82	37.62	8.19
Proline	88.64	94.68	93.90	91.78	92.25	19.35
Serine	60.14	55.59	55.52	53.41	56.16	14.34
Tryptophan	26.62	26.43	26.27	26.42	26.44	0.54
Tyrosine	32.65	33.01	32.47	31.32	32.36	7.14
Valine	48.68	51.13	51.31	49.59	50.18	11.81
Taurine	64.93	75.23	79.33	75.96	73.86	19.44

Table 2a. Concentrations of amino acids (mean \pm SD) during the transitional stage at the specific hours of daytime (09:00–18:00) at which samples were taken (n = 34).

NIGHT (mg/dL)	21:00h	24:00h	3:00h	6:00h	\bar{X} total NIGHT	SD NIGHT
Alanine	51.12	44.71	45.57	42.07	45.87	8.91
Arginine	41.32	37.86	39.37	36.83	38.84	8.25
Aspartic Acid	87.73	82.15	84.69	83.25	84.45	15.68
Citrulline	4.81	3.30	4.73	3.11	3.99	3.08
Glutamic acid	185.94	172.05	178.42	178.11	178.63	37.72
Glycine	27.34	23.62	24.36	22.87	24.55	5.52
Hystidine	27.40	24.30	25.32	23.55	25.14	5.35
Leucine	70.91	66.34	67.34	66.43	67.75	13.35
Methionine	46.10	42.84	35.86	30.07	38.72	10.11
Ornithine	8.80	6.64	5.79	5.63	6.72	3.46
Phenylalanine	39.37	36.19	36.95	35.30	36.95	7.13
Proline	98.25	91.51	89.79	93.10	93.16	19.48
Serine	58.52	50.12	51.37	49.41	52.36	10.04
Tryptophan	26.54	26.62	26.73	26.57	26.62	0.28
Tyrosine	33.54	30.86	31.56	30.18	31.54	6.15
Valine	51.87	47.92	48.60	46.98	48.84	9.23
Taurine	78.75	72.31	71.06	71.55	73.42	13.53

Table 2b. Concentrations of amino acids (mean \pm SD) during the transitional stage at the specific hours of night-time (21:00–06:00) at which samples were taken (n = 34).

DAY (mg/dL)	9:00h	12:00h	15:00h	18:00h	\bar{X} total DAY	SD DAY
Alanine	41.70	44.04	35.15	38.34	39.81	9.56
Arginine	38.93	44.46	34.08	38.16	38.91	11.76
Aspartic Acid	98.74	107.99	96.17	83.57	96.62	17.91
Citrulline	6.11	7.55	6.06	5.41	6.28	2.53
Glutamic acid	153.88	167.03	140.86	137.45	149.81	19.88
Glycine	26.84	30.21	28.39	24.65	27.52	5.65
Hystidine	24.90	22.12	19.13	22.81	22.24	3.82
Leucine	67.73	64.91	63.49	60.35	64.12	11.22
Methionine	13.93	18.09	16.57	18.15	16.69	4.83
Ornithine	9.04	9.98	8.69	8.96	9.17	2.72
Phenylalanine	37.24	40.27	37.37	35.53	37.60	8.87
Proline	83.71	92.26	74.06	70.21	80.06	16.42
Serine	48.00	51.24	41.42	44.27	46.23	12.58
Tryptophan	15.06	14.93	14.96	14.92	14.97	0.22
Tyrosine	36.27	36.00	33.34	29.31	33.73	5.70
Valine	54.84	53.44	52.25	49.80	52.58	9.09
Taurine	63.44	64.32	65.06	64.89	64.43	1.63

Table 3a. Concentrations of amino acids (mean \pm SD) during the mature stage at the specific hours of daytime (09:00–18:00) at which samples were taken (n = 40).

NIGHT (mg/dL)	21:00h	24:00h	3:00h	6:00h	\bar{X} total NIGHT	SD NIGHT
Alanine	42.32	40.60	38.16	41.03	40.53	7.56
Arginine	39.49	39.85	32.69	36.38	37.11	9.88
Aspartic Acid	85.31	86.88	75.54	87.40	83.78	21.11
Citrulline	6.01	6.51	5.72	5.34	5.89	1.61
Glutamic acid	154.29	145.53	139.73	175.02	153.64	29.54
Glycine	23.18	25.32	24.89	26.57	24.99	3.03
Hystidine	24.10	24.33	27.31	25.56	25.32	3.54
Leucine	71.54	68.77	59.92	80.10	70.08	13.21
Methionine	20.62	14.11	11.91	12.72	14.84	2.79
Ornithine	9.31	8.36	9.63	7.79	8.77	3.02
Phenylalanine	34.40	32.07	32.90	35.32	33.67	7.09
Proline	72.54	73.52	71.83	95.78	78.42	18.39
Serine	46.02	46.81	39.31	47.81	44.99	9.83
Tryptophan	15.15	15.11	15.13	15.28	15.17	0.17
Tyrosine	28.59	29.55	30.32	36.47	31.23	6.77
Valine	58.37	52.13	49.54	62.20	55.56	11.41
Taurine	63.99	64.10	63.71	64.68	64.12	2.12

Table 3b. Concentrations of amino acids (mean \pm SD) during the mature stage at the specific hours of night-time (21:00–06:00) at which samples were taken (n = 40).

Amino acids	COLOSTRAL MILK			TRANSITIONAL MILK			MATURE MILK		
	MESOR	Amplitude	Acrophase	MESOR	Amplitude	Acrophase	MESOR	Amplitude	Acrophase
<i>Tryptophan</i>	34.69 ± 0.05	0.12 ± 0.09	4:19 ± 3:21 *	26.53 ± 0.06	0.18 ± 0.06	3:16 ± 2:38 *	15.06 ± 0.06	0.13 ± 0.12	3:00 ± 4:24 *
<i>Methionine</i>	-	-	-	39.75 ± 2.81	6.36 ± 5.26	17:57 ± 3:43 *	15.25 ± 1.79	3.68 ± 3.35	17:19 ± 4:22 *
<i>Aspartic Acid</i>	-	-	-	-	-	-	89.62 ± 5.80	11.27 ± 10.84	12:08 ± 4:34 *
<i>Histidine</i>	-	-	-	-	-	-	23.38 ± 1.04	2.89 ± 1.94	3:14 ± 2:48 *
<i>Phenylalanine</i>	-	-	-	-	-	-	35.25 ± 5.85	3.43 ± 1.59	12:33 ± 1:53 *
<i>Tyrosine</i>	-	-	-	-	-	-	32.12 ± 0.87	4.54 ± 1.62	9:38 ± 1:23 *

Table 4. Chronobiological parameters (mean ± SD) of the amino acids which showed a circadian rhythm.

The units of the MESOR values and amplitudes are mg/dL. The acrophases are given as times of day (08:00–20:00–08:00 light–dark cycle). The *P*-value indicates significance of the fit of the cosine curve to the data. *P*<0.05(*) being considered statistically significant.

Chronobiology of the breast milk components

*Sánchez CL¹, Franco L¹, Sánchez J³, Bravo R¹, Rodríguez AB¹, Rivero M⁴, Barriga C¹,
Cubero J^{1,2}*

¹Chrononutrition Lab, Dept. of Physiology, Fac. of Science. University of Extremadura, Badajoz Spain

² Area in Experimental Sciences Education, Fac. of Education. University of Extremadura, Badajoz, Spain

³Metabolism Lab, Perpetuo Socorro Hospital (S.E.S.), Badajoz, Spain

⁴ Scientific Division Manager, Ordesa Group, Barcelona, Spain

Abstract

Since all the innate immune factors have evolved early in evolution long before the advent of mammals, it appears that milk has evolved as an antimicrobial secretion and that the nutritional function of milk developed subsequently to its protective role. Human milk is a living fluid that changes with time, with its composition and volume being modified both during the course of each day and throughout the breastfeeding period. In this context, the goal of this study is analyze the circadian rhythms of some components present in the breast milk.

Keywords: amino acid, nucleotide, protein, antioxidant capacity, breast milk production, chromatographic techniques.

Corresponding author:

Cristina L. Sánchez López

Dept. of Physiology, Fac. of Science, University of Extremadura.

Av. Elvas s/n 06006 Badajoz, Spain.

Tel. & fax: + 34 924 289 388

crissanchez@unex.es

Introduction

Human milk has many advantages for the development of the breast-fed baby, among proteins, lipids, carbohydrates, hormones and vitamins, and others components, made a complex fluid in the breast milk to adapt to the neonate requirements. Its composition is changing during the breastfeeding, daytime and even each feed. Although changes in some of its components are already well described, (i.e. fats), until now little was known about the circadian pattern and how is caused (Sánchez et al., 2008; Sánchez et al., 2011).

Aims

The aim of our studies was to clarify and to give an explanation about the circadian changes found on the breast milk during the different stages of the breastfeeding.

Materials and Methods

Samples:

77 women of 32 +/- 5 years old, 70.8 +/- 11.6 kg; 1.65 +/- 0.06m and 26.1 +/- 4.3 kg/m², collected every three hours their breast milk in a 24-h period. Samples of breast-milk (5ml) were collected in polystyrene tubes during January to December 2008, and stored frozen at -80°C until assay in duplicate. In general between 6 and 8 samples of breast milk were obtained from each mother (a total 540 samples: 135 from calostrical milk, 180 from transitional milk and 225 from mature milk).

Methods:

To determinate the protein and nitrogen content, the analysis of the human milk samples was based on the Kjeldahl method. Protein contents were calculated from total nitrogen x 6,25.

The amino acids extraction was performed by the technique of Yamawaki (2005) with certain modifications. The amino acids determination was assayed using a ESI-MS/MS: Waters[®] 2795 Alliance HT HPLC (Milan, Italy) coupled to Micromass Quattro Ultima mass spectrometer (Milan, Italy) with an ESI (Electrospray Ionization) source.

The technique of Perrin et al. (2001) was followed for the extraction of the nucleotides. The nucleotides determination was assayed using a Capillary Electrophoresis system (P/ACE MDQ 5510, Beckman-Coulter®).

The total antioxidant activity a measure of all antioxidant present in a biological fluid (in this case, human breast milk), such as vitamins, antioxidants, radical enzyme systems, antioxidant antioxidant unknown interactions. The antioxidant capacity was determined by the improvised spectroscopic method, called TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). The percentage inhibition of ABTS⁺ radical cation by Trolox, a water soluble analogue of alpha tocopherol (vitamin E), which is the standard antioxidant.

The analytical methods used required a minimal volume of only 1mL.

The chronobiological analysis of the data was performed using the Ritme® for Windows software package. The rhythmicity of each nucleotide was studied by cosinor analysis (Halberg, 1967).

With the cosinor analysis, we determined the 95% confidence intervals of the MESOR, amplitude, and acrophase. When this interval contains the value 0, one possibility that amplitude is 0 can not be rejected, so that the existence of a rhythm is not statistically significant. This is equivalent to testing whether the null hypothesis of zero amplitude is rejected at an alpha level of 0.05. The statistical significance of the fit of the cosine curve to the data is indicated by the P-value.

Results

Significant changes were obtained in the daytime concentration of protein and protein nitrogen compared to the night period (table 1). We observed differences in the nitrogen and protein content during the individual stages of lactation, it is just in the population of mature lactating women, and where the components analyzed varied significantly between day and night.

Some amino acids such as tryptophan, which showed a circadian rhythm from stages as early as colostrum phase maintaining this rhythm until the last stage of breast feeding (mature milk). When the milk has fully stabilized, most of the amino acids

presented circadian rhythms. In the table 2 are showed those amino acids with a circadian rhythm in every stage of lactation.

In the nucleotides, the majority of them showed a circadian rhythm (table 3), except uridine 5' monophosphate and thymidine 5' monophosphate.

Finally, we found variation in the antioxidant activity between the nocturnal and diurnal human milk samples. The level of Trolox Equivalent are statistically significant ($P < 0,01$) in the samples collected at 18:00h and 21:00h opposite to the milk samples collected at 24:00h (table 4).

Discussion

Through breast milk is nourishing and developing the intellect as well as improving immune and digestive system of the newborn. Besides all this, the baby would be adjusting his circadian pattern in harmony with his environment (day / night), crucial for the proper functioning and synchronization of all systems in the human body. (Cubero et al., 2005; Sánchez et al., 2008).

The regulation of the sleep/wake cycle is complex, and involves many neurochemical transmission systems. Those of acetylcholine, dopamine, norepinephrine, serotonin, histamine, hypocretin, and orexin act to maintain states of activity (Murillo-Rodríguez et al., 2009; Sánchez et al., 2010), i.e., they are promoters of wakefulness (Hunsley et al., 2004).

In sum, the nutritional components in human breast milk are not static and change during the day, for this reason the breast milk must be sucked in the same moment of lactation.

Stage	Substance (g/dL)	Day period (09:00-12:00h)	Night period (21:00-24:00h)
Colostrals	Protein	1.84	1.92
Colostrals	Nitrogen	0.29	0.30
Transitional	Protein	1.62	1.65
Transitional	Nitrogen	0.25	0.26
Mature	Protein	1.29	1.38*
Mature	Nitrogen	0.20	0.22*

Table 1. Differences between day and night period in the concentrations (mean values) of protein and nitrogen content in human milk samples during lactation. * P<0.05 was consider statistically significant. (n=69)

Stage	Amino Acid (mg/dL)	09:00h	12:00h	15:00h	18:00h	21:00h	24:00h	03:00h	06:00h	P value
Colostrals	Tryptophan	34.74	34.69	34.52	34.61	34.62	34.81	34.76	34.79	0.02*
Transitional	Tryptophan	26.62	26.43	26.27	26.42	26.54	26.62	26.73	26.57	0.01*
Transitional	Methionine	36.68	43.25	44.57	42.34	46.10	42.84	35.86	30.07	0.02*
Mature	Tryptophan	15.06	14.93	14.96	14.92	15.15	15.11	15.13	15.28	0.02*
Mature	Methionine	13.93	18.09	16.57	18.15	20.62	14.11	11.91	12.72	0.03*
Mature	Aspartic acid	98.74	107.99	96.17	83.57	85.31	86.88	75.54	87.40	0.04*
Mature	Histidine	24.90	22.12	19.13	22.81	24.10	24.33	27.31	25.56	0.01*
Mature	Phenylalanine	37.24	40.27	37.37	35.53	34.40	32.07	32.90	35.32	0.002*
Mature	Tyrosine	36.27	36.00	33.34	29.31	28.59	29.55	30.32	36.47	0.001*

Table 2. Concentrations (mean values) of those amino acids with a circadian rhythm. *P<0.05 was consider statistically significant (amino acid with a circadian rhythm). (n=77)

Nucleotide (µg/mL)	08:00-12:00h	12:00-16:00h	16:00-20:00h	20:00-24:00h	24:00-04:00h	04:00-08:00h	P value
Adenosine 5'P	5.48	4.89	4.07	7.30	6.51	2.77	0.04*
Uridine 5'P	4.18	8.50	3.95	3.29	11.62	5.28	0.36
Guanosine 5'P	3.13	4.18	3.09	2.98	3.82	4.61	0.02*
Citidine 5'P	1.95	2.54	2.99	2.20	3.31	1.68	0.02*
Inosine 5'P	2.14	2.94	3.52	3.18	3.53	2.71	0.001*
Thymidine 5'P	3.47	4.49	3.96	4.24	3.46	5.99	0.29

Table 3. Concentrations of the human milk nucleotides during a 24-h period. * P<0.05 was consider statistically significant (nucleotide with a circadian rhythm). All these samples were in mature stage. (n=30)

Trolox equivalent	09:00h	12:00h	15:00h	18:00h	21:00h	24:00h	03:00h	06:00h
TEAC	0.0059	0.0098	0.0082	0.0133*	0.0147*	0.0046	0.0051	0.0048

Table 4. Differences in the concentrations of the antioxidant activity of the human milk (TEAC method) during a 24-h period. All these samples were in colostrum stage. *P<0.01 was consider statistically significant. (n=7)

References

- Cubero J., Valero V., Sánchez J., Rivero M., Parvez H., Rodríguez A.B., Barriga C. 2005. The circadian rhythm of tryptophan in breast milk affects the rhythms of 6-sulfatoxymelatonin and sleep in newborn. *Neuroendocrinology Letters* 26:657-661.
- Halberg S. Tong YL. Johnston EA. 1967 *Cellular aspects from biorhythms*. Springer. New York.
- Hunsley M. & Palmiter R. 2004. Altered sleep latency and arousal regulation in mice lacking norepinephrine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 78:765-773.
- Murillo-Rodríguez E., Arias-Carrión O., Sanguino-Rodríguez K., González-Arias M. & Haro R. 2009. Mechanism of Sleep-Wake Cycle Modulation. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 8:245-253.
- Perrin C., Meyer L., Mujahid C. & Blake C.J. 2001. The analysis of 5'-mono nucleotides in infant formulae by HPLC. *Food Chemistry* 74:245-253.
- Sánchez, C.L., Cubero, J., Sánchez, J., Chanclón, B., Rivero, M., Rodríguez, A.B., Barriga, C. 2008. The possible role of the human milk nucleotides as sleep inducers. *Nutritional Neuroscience* 12:2-8.
- Sánchez C.L., Barriga C., Rodríguez A.B., Franco L., Rivero M. & Cubero J. 2010. Effects of oral administration of L-methionine on activity/rest rhythm. *Acta Physiologica Hungarica* 97:224-233.
- Sánchez C.L., Hernández A., Rodríguez A.B., Rivero M., Barriga C. & Cubero J. 2011. Nitrogen and protein content analysis of human milk. diurnality vs. nocturnality. *Nutrición Hospitalaria* 26(3). In press.
- Yamawaki N., Yamada M., Kan-No T. & Kojima T. 2005. Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 19:171-181.

Acknowledgements

We are grateful to the women who volunteered to patiently extract their breast milk during the 24-h period. This research was financial supported by Ordesa Group and the University of Extremadura for the grant “II Plan de Iniciación a la Investigación. Desarrollo Tecnológico e Innovación”. awarded to Cristina L. Sánchez López. We are also grateful to Ms. Elena Circujano for her technical help and all the medical staff of the hospital for their kind and continuous assistance during the sampling period.



DOCENCIA - FORMACIÓN

NOCIONES EN ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN INFANTIL DURANTE EL PRIMER AÑO DE VIDA.

SMATTERING OF INFANT NUTRITION FOR THE FIRST YEAR.

*Sánchez C.L., *Narciso D., **Rivero M., *Sánchez S., **Johnston S., ***Sánchez J., *Barriga C., *Rodríguez AB., *Cubero J.

*Departamento de Fisiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. **División de Investigación. Laboratorios Ordesa S.L. ***Unidad de Metabolismo. Hospital " Perpetuo Socorro" (S.E.S.). Badajoz. España.

Palabras clave: leche materna, fórmulas infantiles, nutrición infantil.

Key-words: breast milk, formula fed, infant nutrition.

RESUMEN

Está ampliamente reconocido, el principio de la defensa de la lactancia natural en los primeros estadios de la vida, ya que su composición aporta el crecimiento más saludable. Dicha leche natural se divide atendiendo al tiempo que se lleve secretando en: leche pretérmino, calostro, leche de transición y leche madura. A su vez, dependiendo de que esta alimentación inicial sea con lactancia materna o no, se pueden diferenciar tres tipos: Lactancia natural, Lactancia mixta y Lactancia artificial.

Partiendo de la base de la lactancia, nuestro objetivo ha sido el de iniciar una aproximación a la nutrición infantil durante el primer año de vida. Dentro de la Lactancia mixta indicar que su base alimenticia se divide en dos Fórmulas Adaptadas (FA): una de Inicio, desde 0 a 6 meses, y otra de Continuación, a partir de entre 4 y 6 meses. A partir de esta edad el bebé debe ingerir alimentación complementaria o de "beikos" en la cual se añadirán, paralelo al desarrollo del lactante, inicialmente cereales, pasando a frutas, verduras, pescados y por último derivados lácteos.

Igualmente para determinadas situaciones fisio-patológicas están recomendadas una amplia gama de Fórmulas Especiales (FE) como es el caso de: las fórmulas sin lactosa, las modificadas en proteínas, de soja, las elementales o monoméricas, las anti-reflujo, las anti-estreñimiento, las anti-cólico y por último y no menos importante las fórmulas para errores congénitos del metabolismo.

ABSTRACT

It is totally known the principle of the natural breastfeeding defence in the first stages of life, since its composition provides the healthiest growth. The natural breast milk is divided in preterm milk), colostrum, transition milk and mature milk. Additionally, depending on the kind of initial feeding, three types can be differentiated: natural breastfeeding, mixed breastfeeding and artificial breastfeeding. The nutritional basis of the mixed breastfeeding can in turn be separated in two Adapted Formulas (AF): Initiation milk, from 0 to 6 months and Continuation milk from 4 to 6 months. From this age, babies must take complementary feeding or “*beikost*”, in which cereals will be added firstly, going on with fruits, fish and at last, dairy products and junior milk, in a parallel way to the development of the child.

A number of Special Formulas (SF) are recommended to be used for determined pathophysiology situations, such as: without lactose, protein-modified, soy-based, monomeric or elementals, anti-reflux, anti-constipation and last but not least, formulas made for congenital metabolism dysfunctions.

INTRODUCCIÓN

Desde el principio de la Historia, ha estado muy vinculada a la humanidad la relación dieta y salud, pero no ha sido hasta el siglo pasado cuando se ha establecido una fuerte concienciación, a través de las ciencias de la salud hacia los ciudadanos de la importancia de una buena alimentación y nutrición.

En esta revisión vamos a mostrar especial interés a la alimentación y a la nutrición de los niños durante su primer año de vida. El porqué de esto se debe a que es durante esos primeros meses cuando hay una influencia decisiva sobre el posterior desarrollo, tanto a nivel cognitivo como motor [1].

La lactancia, la alimentación infantil.

Podemos diferenciar tres tipos de lactancia principalmente [2]:

- Lactancia natural: Consiste en la alimentación por leche materna. Es considerado el alimento óptimo, único e inigualable para el bebé, ya que su composición está adaptada específicamente a las características digestivas y a las necesidades nutritivas y de crecimiento del niño.
- Lactancia mixta: Hay una alternancia entre la toma de la leche materna con la ingesta de leche procedente de una fórmula artificial. Podría ocurrir esta situación cuando hay una hipogalactia temprana de la madre o bien si ésta no puede ofrecer el pecho a determinadas horas por motivos de trabajo.
- Lactancia artificial: Cuando se llega a la decisión de dar únicamente este tipo de alimentación al bebé, ésta consiste en usar fórmulas lácteas generalmente derivadas de la leche de vaca.

Como hemos dicho anteriormente, la lactancia natural, o lo que es lo mismo, la leche humana, es el alimento óptimo para el lactante [3]. Dentro de la composición de ésta, hay que distinguir los aspectos diferenciados que se refieren a los cinco primeros días de la lactancia y que constituyen la leche calostrual, y a la producción de leche madura, pasados ya los 15 días de adaptación de los mecanismos de la lactogénesis.

Así, los diferentes tipos de leche que son secretados en la glándula mamaria son: la leche del pretérmino si es el caso, el calostro, la leche de transición y la leche madura.

- **Calostro:** Durante el último trimestre de la gestación se ha ido acumulando en el lumen de los alvéolos una sustancia llamada precalostro, formada principalmente por exudado de plasma, células y proteínas: inmunoglobulinas, lactoferrina, seroalbúmina, además de sodio, cloro y una pequeña cantidad de lactosa. El calostro es la leche secretada durante los 4-5 días posteriores al parto. Tiene aspecto amarillento y espeso, de alta densidad y poco volumen (2-20 ml por toma).

- **Leche de transición:** Es la leche que se produce entre el día 4 y 15 posterior al parto. Al 4º ó 6º día se produce un incremento brusco en la producción de leche (subida de la leche), que sigue aumentando hasta alcanzar un volumen de 600-700 ml/día. Esta leche es de composición intermedia y varía día a día hasta alcanzar los niveles de la leche madura.

- **Leche madura:** Es la leche secretada a partir de las primeras dos semanas tras el parto. Tiene una gran variedad de componentes nutritivos y no nutritivos. Su volumen promedio es de 700-900 ml/día durante los 6 primeros meses postparto.

Comparando la leche calostrual con la madura, hay que considerar diferentes aspectos en relación con su composición en hidratos de carbono, proteínas, nitrógeno total, nitrógeno no proteico (NNT), grasas, minerales y vitaminas.

Tabla 1. Comparativa entre la composición del calostro y de la leche madura. Tomado de Lawrence R.A. La lactancia materna. Una guía para la profesión médica. (4)

Componente	Calostro/100 ml	Leche madura/100 ml
Energía (Kcal)	58	70-75
Agua %	87,2	88
Lactosa g	5,3	7,3
Nitrógeno total mg	360	171
NNP mg	47	42
Proteínas totales g	2,3	0,9
Caseína mg	140	187
Alfa lactoalbúmina mg	218	161
Lactoferrina mg	330	167
IgA mg	364	142
Grasas totales g	2,9	4,2
Ácido linoleico: (% del total)	6,8	7,2
Ácido linolénico		1,00
C20 y 22 poliinsaturados	10,2	2,9
Colesterol mg	27	16
Vitamina A mcg	89	47
Betacaroteno mcg	112	23
Vitamina D mcg	-	0,004
Vitamina E mcg	1280	315
Vitamina K mcg	0,23	0,21
Tiamina mcg	15	16
Vitamina B6 mcg	12	28
Vitamina B12 mcg	200	26
Ácido ascórbico mcg	4,4	4,0
Calcio mg	23	28
Magnesio mg	3,4	3,0
Sodio mg	48	15
Potasio mg	74	58
Cloro mg	91	40
Fósforo mg	14	15
Cobre mcg	46	35
Yodo mcg	12	7
Hierro mcg	45	40
Zinc mcg	540	166

Nociones sobre la lactancia artificial.

Las fórmulas lácteas infantiles son aquellos productos destinados a satisfacer (de manera parcial o total) las demandas nutritivas de los lactantes durante esta etapa de su vida, cuando la alimentación por leche materna no es posible o existe alguna contraindicación se recurre a este tipo de fórmulas adaptadas (FA). Podemos distinguir tres tipos de fórmulas [5,6,7]:

- I-Fórmula de inicio: Cubre los requerimientos de los primeros 0-6 meses de vida.
- II-Fórmula de continuación: A partir de los 4-6 meses de edad. Es necesario que en esta etapa el bebé, además de ser alimentado con este tipo de leche, empiece a ingerir otros alimentos. Esta alimentación complementaria es también conocida como “*beikost*”.
- III-Fórmulas de crecimiento o Junior: A partir del primer año de vida. De reciente aparición en el mercado y caracterizadas por no existir una recomendaciones exclusivas para la formulación de estas leches ni tampoco una legislación específica, por lo que se ajusta a las recomendaciones para leches de continuación y a estudios sobre factores nutricionales que se van realizando [8].

Entre las diferencias en la composición de la fórmula de inicio (FI) y la fórmula de continuación (FC) se encuentra el contenido energético, el cual es más elevado en la FI ya que es la única vía de alimento que tiene el lactante. También difieren en el índice de caseína/suero, el cual debe ser modificado para la FI (40/60 o 50/50), ya que el aporte proteico supone una gran carga de solutos y radicales ácidos para el riñón y una sobrecarga de aminoácidos podría provocar hipercalemias. Por el contrario, en la FC (80/20) no es necesaria modificación alguna.

En el caso de los hidratos de carbono, en la FI está permitida una pequeña adición en ésta de glucosa y dextrinomaltoza, pero no deben estar presentes ni el almidón ni las sustancias espesantes. En cambio, en la FC no se puede añadir nada que no sea la lactosa, y aún así, ésta debe estar sólo hasta el 20%.

La composición de las grasas en la FI debe ser tal que se consiga una absorción del 85%. Se permite una mezcla de grasas animales y vegetales para conseguir un ácidograma similar al de la leche materna. En cuanto a las grasas saturadas, su concentración debe ser pequeña, mientras que la de los ácidos grasos monoinsaturados debe ser más elevada. En la FC no hay razón para sustituir totalmente la grasa animal por la vegetal, pero cuando la fórmula contiene grasas vegetales, el contenido de ácido linoleico es inferior a 300 mg/Kcal. Es conveniente además vigilar los aportes de ácido láurico y mirístico. El contenido en calcio en la FC suele ser inferior al que hay en la FI.

En ambos tipos de leche se encuentran presentes sustancias prebióticas (crecimiento de bifidobacterias) y además en la FC también hay sustancias probióticas.

La alimentación complementaria o “Beikost”.

Puesto que la FC no debe ser el único alimento que tome el bebé durante esta etapa, además de éste, se le irán incorporando a la dieta paulatinamente nuevos alimentos (“*beikost*”), abarcando no solo sólidos y semisólidos (papillas, purés...), sino también alimentos líquidos, como los zumos de frutas.

Es recomendable iniciar la introducción de los mismos a partir de los 4 meses de vida, a excepción del gluten, que se recomienda a partir de los 7 meses. Hasta el año de edad, la ingesta

de leche no debe ser inferior a medio litro al día y la leche de vaca no se debe administrar hasta pasado el primer año.

Hay mucha documentación [9] sobre las fechas de introducción específicas para cada alimento. Aquí se expondrán de manera general:

- Cereales: Suele ser el primer alimento no lácteo que se introduce (a partir del 4º mes de vida). Son ricos en hidratos de carbono y energía, aportados también, aunque en menor cantidad, proteínas, minerales, ácidos grasos esenciales y vitaminas.
- Frutas: Deben administrarse a partir de que el bebé toma su primera papilla de cereales, es decir, sobre el 5º mes.
- Verduras y carnes: Se administran en purés (verdura, carne y aceite), a partir del 6º mes. Tienen mucho contenido en fibra, vitaminas, sales y minerales (sobre todo hierro). Pueden usarse carnes rojas y blancas siempre que se preparen cocidas y sin grasa. Lo más recomendable es comenzar por carne de pollo ya que es más digestible. Las verduras foliáceas (espinacas, acelgas, col...) pueden incorporarse a partir de los 9-11 meses.
- Pescados blancos: A partir del 9º mes pueden ser alternados con la carne.
- Huevo: Sobre el 12º mes. No se recomienda su ingestión en estado crudo, así se evita una intoxicación por *Salmonella* además de permitir una buena utilización digestiva de la albúmina.
- Legumbres: Son una fuente de fibra, proteínas, vitaminas y minerales extraordinaria. Pueden administrarse a partir del 12º mes.
- Yogur: Suele introducirse a partir de los 8º meses de edad. Son proteínas parcialmente hidrolizadas con mucho calcio y poca concentración en lactosa.
- Mantequilla: No es convencional en lactantes menores de un año ni los alimentos que suelen contenerla (dulces, postres).
- Quesos: Aporta calcio y proteínas de excelente calidad pero, como en el caso anterior, no están recomendados a bebés menores de un año de edad ya que ambos tienen efectos hipercolesteremiante.

Fórmulas Especiales

Al igual que antes hemos comentado el uso de las fórmulas adaptadas (dentro de ellas: la FI y la FC), también existen otro tipo de fórmulas llamadas especiales (FE) que son administradas a aquellos bebés que presentan intolerancias o alergias dietéticas por errores congénitos del metabolismo o bien por problemas gastrointestinales. Podemos encontrarlos [10, 11]:

- Fórmulas sin lactosa: Derivan de la leche de vaca, pero en ellas se ha sustituido la lactosa por dextrinomaltoza o por polímeros de glucosa. Está indicado su uso cuando existe un déficit de lactasa intestinal.
- Fórmulas de soja: A base de aislado proteico de soja que sustituye a la proteína de la leche. No contienen ni lactosa ni sacarosa, siendo la dextrinomaltoza o los polímeros de glucosa los hidratos de carbono que están presentes. Deben ser suplementadas con carnitina y metionina además de cobre, hierro, zinc y calcio. Su uso está recomendado para lactantes con galactosemia, intolerancia a la lactosa e hijos de padres vegetarianos que no quieren dar proteínas animales a sus hijos. No se ha demostrado que prevengan o traten los cólicos en los bebés ni para prevenir la enfermedad atópica.
- Hidrolizados proteicos: Son de dos tipos, fórmulas hipoalergénicas (H) o semielementales, y fórmulas hipoantigénicas (HA). Las H son de alto grado de hidrólisis y con ellas se tratan las alergias e intolerancias a las proteínas lácteas de

vaca además de actuar en la prevención 1ª de alergopatías. En contraposición tienen un mal sabor, alto coste y alta osmolaridad. Las HA están parcialmente hidrolizadas, por lo que tienen un bajo grado de hidrólisis y son parecidas a las FI. Están diseñadas con fines preventivos, no son indicadas con fines terapéuticos cuando existe alergia a las proteínas de leche de vaca, ya que está documentada la producción de reacciones graves y anafilaxia [12].

- Fórmulas elementales: Indicadas en situaciones de síndrome diarreico grave o de fracaso intestinal sin respuesta a H. Estos preparados no dejan residuos, ya que sus componentes pueden ser absorbidos con una mínima digestión. Llevan L-aminoácidos, grasas como triglicéridos de cadena media y aceite de maíz. Como hidratos de carbono lleva dextrinomaltoza o polímeros de glucosa. Sus desventajas son que tienen un mal sabor, un alto coste y una alta osmolaridad.
- Fórmulas antiestreñimiento (AE): Son las más apropiadas para lactantes con tendencia al estreñimiento. En ellas hay un alto porcentaje de ácido palmítico en posición ω , lo que favorece la absorción de la fracción de grasa de la leche, del calcio y del magnesio, minimizando así la formación de jabones cálcicos en el intestino, los cuales son los principales responsables de las heces duras.
- Fórmulas antirregurgitación (AR): Son FI y FC que llevan adicionadas sustancias espesantes para controlar o minimizar los vómitos y regurgitaciones excesivas del lactante, así como terapéutica dietética en el reflejo gastroesofágico no complicado.
- Fórmulas anticólico (AC): Con ellas se trata de evitar los factores desencadenantes en el cólico del lactante. Tienen una hidrólisis parcial de las proteínas séricas, bajo contenido en lactosa, aporte de fructooligosacáridos para conseguir un efecto prebiótico, mayor concentración de ω -palmitato y las grasas de cadena media.
- Fórmulas nutricionales Día/Noche: Mediante la utilización, combinada y complementaria, de una leche infantil durante la noche (18:00-06:00) y otra durante el día (06:00-18:00), se pretende reproducir las variaciones del contenido nutricional de la leche materna a lo largo de la jornada, ayudando a sincronizar los ciclos de vigilia/sueño de los lactantes. Favorecen así el inicio del sueño para conseguir una correcta instauración de los periodos de descanso y actividad a partir de los primeros meses de vida [13].

Concluyendo podemos decir, que a pesar de la gran variedad de productos en el mercado para la alimentación y nutrición de los bebés, hasta el momento no hay ningún alimento que supere la calidad y las propiedades biológicas de la leche materna. Aunque ya hay numerosos estudios que se están llevando a cabo para intentar asemejar lo máximo posible estos productos artificiales a la leche humana, siempre que no sea por cuestiones patológicas, es mejor decidirse por una alimentación con lactancia natural, ya que una alimentación inadecuada durante el primer año de vida conduce no a trastornos nutritivos, sino que puede ser causa del desarrollo de enfermedades de adulto.

Lactancia natural:

- Leche pretérmino.
- Calostro.
- Leche de transición.
- Leche madura.

Lactancia mixta.

Lactancia artificial:

- Fórmulas adaptadas (FA):
 - Fórmulas de inicio (FI ó 1).
 - Fórmulas de continuación (FC ó 2).
 - Fórmulas de crecimiento (*Junior* ó 3).

- Fórmulas especiales (FE):
 - Fórmulas sin lactosa.
 - Fórmulas de soja.
 - Fórmulas modificadas en proteínas:
 - Fórmulas hipoantigénicas (HA).
 - Fórmulas hipoalergénicas (H).
 - Fórmulas elementales.
 - Fórmulas antiestreñimiento (AE).
 - Fórmulas antirreflujo (AR).
 - Fórmulas anticólico (AC)
 - Fórmulas nutricionales Día/Noche.

Tabla 2. Resumen-Clasificación de la lactancia, atendiendo a la composición de la misma.

Agradecimientos

Los autores agradecen su colaboración a D^a Elena Circujano, Técnico de nuestro laboratorio. Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología. Ref:AGL 2000/0182/P4/03 y los Laboratorios Ordesa S.L. Ref:003-03.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Wen LM, Baur LA, Rissel C, Wardle K, Alperstein G, Simpson JM. Early interventions of multiple home visits to prevent childhood obesity in a disadvantaged population: a home based randomised controlled trial (Healthy Beginning Trial). BMC Public Health. 2007; 7:76.
- [2] Ballabriga A, Carrascosa A. Nutrición en la infancia y adolescencia. 2001. 2^a ed. Ergon S.A. Madrid; p. 119-154.
- [3] FAO/WHO/UNU Expert Consultation. WHO Technical Report Series 724, Geneva: World Health Organization of United Nations.
- [4] Lawrence RA. La lactancia materna. Una guía para la profesión médica. 4^o ed. Madrid. Mosby/Doyma, 1996.
- [5] BOE nº 30 de 04.02.1998. 2417. Real Decreto 72/1998 de 23.02.1998. Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los preparados del lactante y de continuación; p. 3772-3780.

[6] BOE nº 83 de 07.04.1998. 8200. Real Decreto 490/1998 de 27.03.1998. Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad; p. 11638-11643.

[7] DO L 401 de 30.12.2006. Directiva 2006/141/CE de la Comisión de 22.12.2006. Modificación de la Directiva 1999/21/CE relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación; p. 1-33.

[8] Ferrer B, Dalmau J. Formulas de continuación y formulas de crecimiento. Acta Pediatr Esp. 2005;63: 471-475.

[9] Camarero E, Culebras JM, González J, León M. Nutrición Humana en el Estado de Salud. Tomo III. En: Gil A. Tratado de Nutrición. 2005. 1ª ed. Acción Médica. Madrid; p. 284-297.

[10] Soler MC, San Segundo C. Protocolos de digestivos: Indicaciones y prescripción de fórmulas especiales. Bol Pediatr 2006; 46:200-205.

[11] Suárez L. Charla con expertos: prescripción de fórmulas especiales. Bol Pediatr 2005; 45:100-102.

[12] Plaza AM, Tortajada M, Varea V, Giner MT, Martín MA, Sierra JI. Alimentación del lactante con una reacción adversa a las proteínas de la leche de vaca. Acta Pediatr Esp 2003; 61:249-254.

[13] Cubero J, Narciso D, Aparicio S, Garau C, Valero V, Rivero M, Esteban S, Rial R, Rodríguez AB, Barriga C. Improved circadian sleep-wake cycle in infants fed a day/night dissociated formula milk. Neuro Endocrinol Lett 2006; 27:373-80.

ISSN 1695-6141

© [COPYRIGHT](#) Servicio de Publicaciones - Universidad de Murcia



CLÍNICA

VALORACIÓN NUTRICIONAL EN LACTANTES DE ENTRE 8 A 12 MESES DE VIDA

NUTRITIONAL FACTS IN INFANTS FROM 8 TO 12 MONTHS OF AGE

*Sánchez, CL., **Johnston, S., *Sanchez, S., **Rivero, M., *Rodríguez, AB,
*Barriga, C. *Cubero, J

*Departamento de Fisiología. Facultad de Ciencias. Badajoz. **Grupo Ordesa. Barcelona. España

Palabras clave: Lactantes, nutrición complementaria, beikost.

Keywords: Infants, Complementary Nutrition, Beikost.

RESUMEN

Objetivo: En este trabajo se ha tratado de conocer profundamente la alimentación infantil con lactancia complementaria, a través de un cuestionario de consumo de alimentos de dos semanas de duración, el cual fue completado por los padres de lactantes de entre 8 y 12 meses, de la provincia de Badajoz. Para su análisis y cuantificación nutricional se manejó la aplicación informática *Dial*®.

Resultados: El análisis de la dieta diaria mostró en su estudio que es repetitiva y equivalente en todos los lactantes durante este intervalo de edad, la cual estaba constituida: al inicio del día por leches de continuación y cereales infantiles, continuando con potitos de verduras con carne, potitos de fruta y por último al final del día, de nuevo leches de continuación y cereales infantiles. Indicar que la ingesta energética era correcta ($1355 \pm 252,93$ kcal), destacando que en lo que respecta a macronutrientes el porcentaje en proteínas se encontró elevado ($44,40 \pm 5,014$ g) frente a las recomendaciones diarias. Además de presentar un patrón dietético repetitivo y constante en toda la población.

Conclusión: En la población estudiada con lactancia complementaria, la dieta de estos lactantes entre 8 y 12 meses de vida se adecua a las necesidades energéticas diarias para dicho periodo de crecimiento, pero mantienen una inadecuada ingesta diaria de proteínas.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to analyze the diet of infants that receive supplemental breast milk, by way of a two-week survey on nutrition consumption, completed by the parents of infants between 8 and 12 months of age from the province of Badajoz, Spain. *Dial*® software was used for the nutritional analysis and quantification.

Results: The analysis of the daily diet shows in this study that it is repetitive and equivalent in all infants during this age interval, which is made: at the beginning of the day for follow-on milk and infantile cereals, followed by vegetable baby food with meat, fruit baby food, and finally at the end of

the day follow-on milk and cereals again. Indicating that energy intake was correct (1355 ± 252.93 kcal), highlighting that regarding macronutrients the protein percentage intake (44.40 ± 5.014 g/day) is high compared to the daily recommendations. In addition, it presents a repetitive and constant dietary pattern throughout all the participants.

Conclusion: In our study population with supplementary feeding, the diet of these infants between 8 and 12 months of age is suited to the daily energy needs for that period of growth, as well as an inadequate daily ingestion on proteins.

INTRODUCCIÓN

La incorporación de los diferentes alimentos a lo largo del crecimiento del lactante tiene un calendario fehacientemente descrito y con un rigor temporal el cual puede ser consultado en cualquier manual de nutrición infantil (Ballabriga 2001; Gil 2005).

Partiendo en el nacimiento de una alimentación exclusivamente con lactancia natural, artificial o mixta, se pasa al cabo de unos pocos meses de vida a una alimentación complementaria o *beikost*, con otros alimentos diferentes a la leche, como son los cereales infantiles sin gluten, siguiendo con papillas de frutas. Posteriormente, aproximadamente a partir del 8º mes de vida, se incorporan los cereales con gluten, purés de verdura con carne, siguiendo con pescado y se finaliza el primer año de vida con derivados lácteos. Se consigue con ello que la base de la alimentación diaria ya no sea en su mayor proporción de origen lácteo, ya que la demanda tanto de macronutrientes como de micronutrientes en los niños durante este periodo, no puede ser compensada solamente con el aporte de la leche.

El ajuste dietético, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, debe estar perfectamente regulado y equilibrado. Las condiciones de preparación y elaboración de dichos alimentos deben ajustarse a unas estrictas medidas tanto en su composición como durante su producción.

La demanda en macronutrientes en esta fase de crecimiento es elevada en comparación con otras fases de la vida. El consumo de carbohidratos y grasas debe ser considerable debido a que las recomendaciones dietéticas aconsejadas (R.D.A) de energía en dicho periodo de desarrollo son muy elevadas (98 kcal/Kg de peso), ya que son requeridas para el proceso de crecimiento y desarrollo. El aporte en grasas recomendado disminuye respecto al indicado al nacer, pasando del 35 al 30% a partir del 4º mes de vida (Gil 2005). Sin embargo, el aporte de proteínas aún debe ser importante (1,6 g/kg/día -Kathleen 1998- o de 14 g/día -Gil 2005-), aunque no en la medida de los primeros meses de vida.

Se ha considerado que el intervalo de meses en que se ha centrado este estudio, es un momento crucial en la etapa de la alimentación infantil, ya que al final del primer año de vida se comienza a establecer un patrón dietético, el cual determinará un correcto desarrollo, así como se formará la base de la futura alimentación en el niño de corta edad.

Este trabajo trata de aportar nuevos datos en la nutrición infantil al final del primer año de vida, y para ello se ha centrado en la alimentación diaria de dicho colectivo de lactantes analizando la cantidad y calidad de los macronutrientes ingeridos, así como la proporción de los mismos. Nuestro objetivo ha sido profundizar en el posible aporte desequilibrado de carbohidratos, proteínas y grasas, hecho que podría albergar una alteración futura, como es el caso de la obesidad (Dehghan 2005).

SUJETOS Y MÉTODOS

Población a estudio

En el estudio participaron lactantes sanos (n=15), entre 8 y 12 meses de vida, bajo la supervisión de sus pediatras y procedentes tanto de consulta privada o Centros de Salud de la provincia de Badajoz. Dicho estudio fue revisado y aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Extremadura.

Distribución del cuestionario para estudio de la dieta

Las encuestas dietéticas ajustadas a las características de la población de estudio fueron entregadas a los padres o tutores de los lactantes para su cumplimentación durante dos semanas y posteriormente fueron recogidas y revisadas. En caso de duda o aclaración se les facilitó a los padres el número de teléfono de contacto del investigador.

Cálculo dietético y nutricional

Tras la recogida de la encuesta dietética de 2 semanas de duración, complementada diariamente por los padres, se realizó el cálculo nutricional apropiado mediante el software Dial[®].

Análisis estadístico

Dicho análisis se centró en el estudio descriptivo del conjunto de datos, utilizando la media de los datos y desviación estándar como medida de dispersión ($\bar{X} \pm D.S.$).

RESULTADOS

Estudio de la dieta

El patrón dietético diario observado en esta población de lactantes es repetitivo y está compuesto por la mañana en el desayuno aproximadamente de 10 cacitos de leche de continuación y 4 cacitos de cereales (medida por *cacito*: 5 g); durante el almuerzo un potito entero de 250 g de verduras con carne de pollo o ternera (y en ciertos casos de lenguado) acompañado de algún yogur de frutas; a media tarde un potito de fruta de 250 g (que por norma general nunca se llega a ingerir entero), al cual se suele acompañar de un yogur natural o con pequeñas proporciones de algún alimento rico en carbohidratos, como es pan blanco o galletas (a lo sumo dos unidades); al final del día, antes de dormir ingerían 8 cacitos de leche de continuación con 4 cacitos de cereales. Cabe indicar que en un gran porcentaje de los lactantes se producían ingestas adicionales de leche de continuación y cereales en medio de la noche.

Sugerir que los alimentos que componían la dieta pertenecían a diferentes marcas comerciales de alimentación infantil, y en el menor de los casos, elaborados diariamente por las madres. Como se observa, la dieta en principio es correcta, con una alta proporción de los llamados alimentos saludables (leche, cereales, legumbres, pescado y fruta).

Durante las dos semanas que se registró la información en el cuestionario, algunos lactantes se encontraron bajo tratamiento farmacológico para el estreñimiento, asma, alergia o tomaron antibióticos. Además, estos bebés llevaban puesto un acelerómetro en el tobillo

para un estudio paralelo del sueño, sin que ello causara en algún momento trastornos alimentarios durante dicho periodo de estudio.

Estudio nutricional

La ingesta de alimentos infantiles se transformó a energía y nutrientes. Respecto al aporte energético (**Figura 1**), indicar que éste correspondió a $1355 \pm 252,93$ kcal/día de media, levemente superior al recomendado en este tramo de edad de 98 kcal/día/Kg de peso.

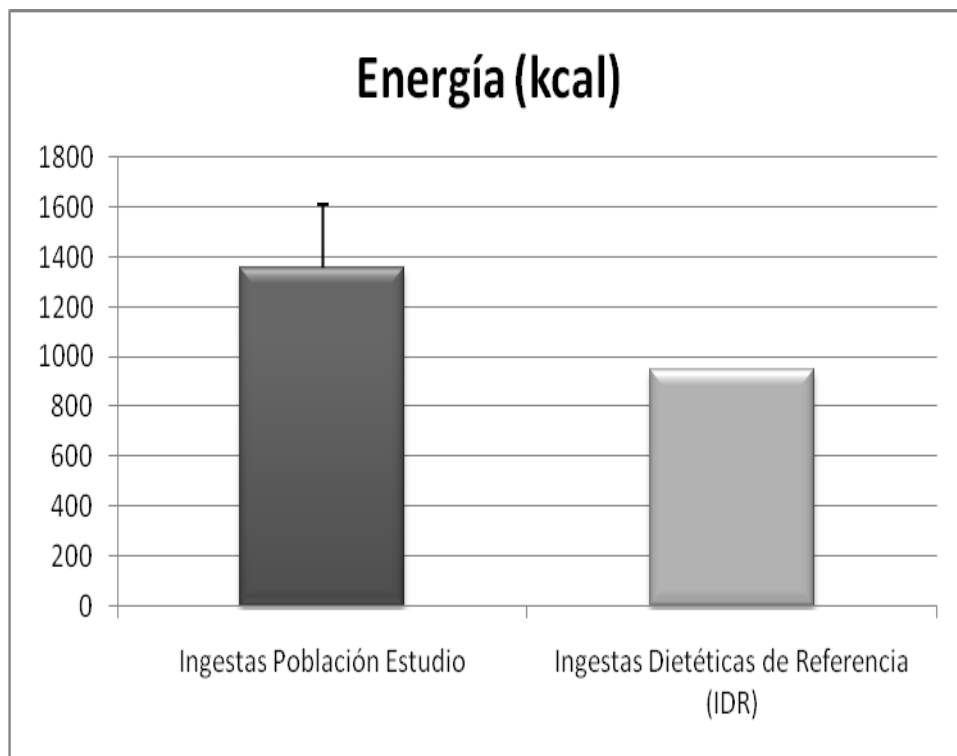


Figura 1. Aporte de energía ($\bar{X} \pm D.S.$) en lactantes de entre 8 y 12 meses de vida comparado con la R.D.A. para esa edad (n=15).

Respecto al aporte de macronutrientes, los cuales se han representado comparados con las R.D.A. en la **Figura 2**, indicar que los carbohidratos, proteínas y grasas totales consumidos, corresponden un valor medio de $209,70 \pm 43,76$ g/día, $44,40 \pm 5,01$ g/día y $37,27 \pm 7,39$ g/día respectivamente, encontrándose tanto carbohidratos como proteínas muy por encima de las R.D.A. A su vez, la cantidad ingerida en micronutrientes (minerales, oligoelementos y vitaminas liposolubles e hidrosolubles), no se encontraba disminuida respecto a las R.D.A. para esa etapa de crecimiento cercana al año de edad (datos no mostrados).

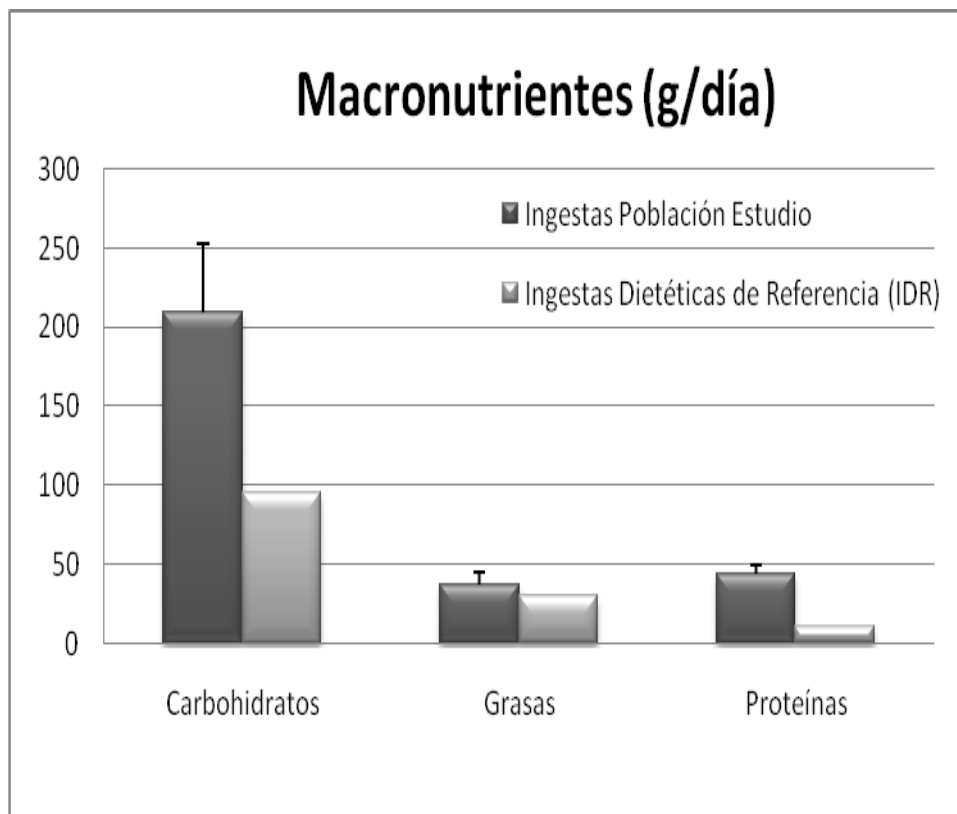


Figura 2. Ingesta media de macronutrientes ($\bar{X} \pm D.S.$); Carbohidratos, Grasas Totales y Proteínas en lactantes de entre 8 y 12 meses de vida, comparada con R.D.A. para esa edad (n=15).

Respecto a las características antropométricas (**Tabla 1**) podemos indicar que respecto al peso medio de los lactantes al final de las dos semanas de estudio, éste se encontraba cercano al percentil 50 correspondiente a su edad, observándose especialmente que en el caso de las niñas se encontraba levemente inferior al peso medio.

Tabla 1. Valores antropométricos de la población a estudio.

Sexo	Edad	Peso Medio	Peso Percentil 50
Niñas	11 meses	8,9 kg	9,2 kg
Niños	10 meses	10 kg	9,6 kg

Valores ($\bar{X} \pm D.S.$) de lactantes entre 8 y 12 meses de vida, (n=15).

DISCUSIÓN

Tras el análisis nutricional llevado a cabo en niños/as de 8 a 12 meses de edad, podemos indicar que el aporte energético es el óptimo para dicha edad, ya que se recomienda en el periodo de edad entre 6 y 12 meses de vida un aporte de 98 kcal/día/Kg de peso y puesto que el peso medio de dicha población a estudio es de 9,5 Kg, le correspondería un aporte energético medio de 931,58 kcal/día.

Si el total de energía es 1355 kcal/día, el equilibrio en las proporciones de macronutrientes para dicho colectivo de lactantes según Gil (2005) sería el siguiente: para los carbohidratos entorno a un 50% del total de energía, es decir 677,5 kcal/día que corresponderían a 169,37

g/día; para las grasas totales se recomienda un 35% del total de energía consumida, lo que correspondería a 474,25 kcal/día, es decir 52,62 g/día; por último en cuanto a las proteínas se sugiere un 15% de la energía total ingerida siendo este valor de 203,25 kcal/día, lo que correspondería a 50,81 g/día. Dichas proporciones indican valores en peso elevadas respecto a las R.D.A. para este colectivo, todo ello como consecuencia de una elevada ingesta calórica.

Para esta etapa del desarrollo se considera 1 g/Kg/día (A. Gil 2005) ó 13 g/día (NAS) de proteína como cantidades dietéticas recomendadas, sin embargo en esta población a estudio (peso medio de 9,5 Kg) su ingesta proteica es de $44,40 \pm 5,01$ g/día, excesivamente superior respecto a esas recomendaciones bibliográficas, lo que constata que dicha población sigue una dieta desaconsejada y totalmente desequilibrada, por lo que se debería disminuir el aporte proteico como prevención a futuras alteraciones renales. Indicar que las sugerencias para una buena ingesta proteica deberían estar mejor estandarizadas en base a las diferentes recomendaciones descritas por diferentes autores y sociedades (Gil 2005, NAS).

Como se ha observado, el aporte de grasas es de 37,27 gramos, el cual se encuentra muy cercano al recomendado para este colectivo de lactantes (Lama More 2005; NAS) y aunque en porcentaje es menor al recomendado de un 30 % de la energía total, dicho desequilibrio se compensa con la ingesta en mayor proporción de carbohidratos, con la posible desventaja de no poder llegar a ingerir las recomendaciones diarias de ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, está descrito que hasta el décimo mes de vida no se introduce el puré de pescado, fuente rica en grasas, el cual generalmente se elabora con pescado blanco (como sería el lenguado), con menor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (Gil 2005). Por ello sería recomendable que fuera de pescado azul ya que su contenido en ácidos grasos $\omega 3$ es mayor.

Respecto a la ingesta de micronutrientes (minerales, oligoelementos y vitaminas liposolubles e hidrosolubles), debemos reincidir que no se cuantificaron valores deficientes para ninguno de ellos. A la vez, cabe destacar la existencia de un patrón dietético muy repetitivo.

Insistimos en el hándicap de no poseer un tamaño de muestra muy elevado, pero dicha posible deficiencia se contrarresta con el número de días (14 de media por lactante) con el que se refleja la alimentación de estos niños en el cuestionario completado por los padres y posteriormente analizado.

Como conclusión, indicar que se observa una dieta saludable y correcta para dicha población de lactantes en estudio puesto que las recomendaciones de los nutrientes se encuentran cubiertas, pudiendo aconsejar un mayor aporte en grasas y una ligera restricción en carbohidratos y proteínas.

Agradecimientos

Laboratorios Ordesa S.L. ha financiado este trabajo a través del proyecto 167/06. Agradecer también a la Universidad de Extremadura por la beca de investigación "II Plan de Iniciación a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación" otorgada a Cristina L. Sánchez López, y a Elena Circujano por su asistencia técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- Beaton HG. (1985) Nutritional needs during the first year of life. Some concepts and perspectives. *Pediatric Clinic of North America* (32) 2: 275-288.
- Briefel R et al. (2006) Feeding infants and toddlers Study: Do vitamin and mineral supplements contribute to nutrient adequacy or excess among US infant and toddlers? *American Dietetic Association*. S52. 1-15.
- Ballabriga A y Carrascosa A (2001) *Nutrición en la infancia y la adolescencia*. 2ª Ed. Ergón. Madrid.
- Dehghan M et al. (2005) Childhood obesity, prevalence and prevention. *Nutrition Journal*. (4): 1-8.
- Dietary References Intakes for Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (2002/2005); Dietary References Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfates.
- Gil Hernández A (2005) *Tratado de nutrición*. 1ª Ed. Acción Médica. Madrid.
- Kay Fox M et al. (2006) Source of energy and nutrients in the diets of infants and toddlers. *American Dietetic Association*. S28. 1-15.
- Kathleen Mahan L y Escott-Stump S (1998) *Nutrición y dietoterapia de Krause* 9ª Ed. McGraw Hill Interamericana Editores. Mexico.
- Lama Moré RA y Moraix López A (2005) Las grasas en la alimentación infantil. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados. *Anales de pediatría*. 3: 16-23.
- Lázaro A y Marín-Lázaro JF (2002) Alimentación del lactante sano. Protocolos diagnóstico y terapéutico en pediatría. *Asociación Española de Pediatría*. 2: 311-320.

ISSN 1695-6141

© [COPYRIGHT](#) Servicio de Publicaciones - Universidad de Murcia



4. DISCUSIÓN

La leche materna es el alimento óptimo e inigualable para los lactantes. Su volumen y composición de macro y micronutrientes difieren tanto a lo largo de la lactancia, como a lo largo del día y de la noche y durante la propia toma. Por tanto, dentro de los tres grandes períodos en los que se puede dividir la lactancia materna (calostro, leche de los primeros 4-5 días tras el parto; leche de transición, hasta las 2 o 3 primeras semanas y leche madura, a partir de las 3 semanas del nacimiento), la composición varía considerablemente.

En el caso de las proteínas por ejemplo, la concentración disminuye de 2,3 g/ml en el calostro a 1 g/100 ml en leche madura, mientras que la lactosa incrementa su nivel de 5,5 g/100 ml durante los primeros días de lactancia a 6,8 g/100 ml en leche madura. Además, los cambios dentro de una misma toma son considerables, en función del volumen de leche secretado.

La composición de la leche materna presenta igualmente variaciones a lo largo del día y de la noche, valores endógenos que dependen tanto del patrón de comida de la madre-lactante como de los ritmos circadianos de la madre. De hecho, hay un gran número de estudios publicados al respecto sobre las variaciones circadianas de numerosas sustancias nutricionales en la leche como:

- *Se han encontrados en leche materna valores máximos al atardecer para el cortisol [74], sodio, potasio, [75], los folatos y los lípidos [76 y 77]. En cambio el máximo de orgánulos citoplasmáticos en dicha leche ocurre después del anochecer, mientras que hay concentraciones máximas matutinas de cobre, calcio, zinc, hierro [78] y lactosa, estando esta última relacionada de forma inversa con otros oligosacáridos [79].*

- *Los aminoácidos aspártico, alanina, glutamina, treonina y glutamato, alcanzan su concentración máxima al principio de la tarde [80]. El triptófano, aminoácido esencial y presente en la leche materna, produce un efecto inductor del sueño ya que es precursor de la serotonina y la melatonina. Se ha observado que tanto el triptófano como la melatonina en leche materna presentan variación circadiana de sus niveles en este fluido, siendo estos valores mayores durante el período nocturno que en el período diurno [81 y 82].*

Las variaciones circadianas de los componentes nutricionales de la leche humana son muy importantes para el desarrollo óptimo del recién nacido, habiéndose conservado evolutivamente para intentar acondicionar en la mayor brevedad al neonato con el entorno.

Así, la melatonina en la leche materna, al alcanzar sus máximos niveles durante el periodo de oscuridad le está indicando al bebé que es de noche, al igual que los altos niveles de cortisol durante las primeras

horas de la mañana en leche materna le señalan al recién nacido el período diurno.

Hasta el momento son prácticamente inexistentes las leches maternizadas (ya sean de inicio, de continuación o junior) que hayan tenido en cuenta las variaciones nutricionales circadianas. Hay que resaltar que en los últimos años se han diseñado y comercializado, junto a nuestro laboratorio de Fisiología de la Universidad de Extremadura y la Universidad de las Islas Baleares, las leches infantiles “Blemil Plus 2 Fórmula de Noche[®]” del Grupo Ordesa, las cuales han sido desarrolladas para inducir el ciclo sueño/vigilia en el recién nacido.

Estas leches artificiales son fórmulas disociadas en diferentes sustancias nutricionales. Tienen así, de manera controlada, todos aquellos ingredientes que favorecen -o no impiden- el estado de vigilia, como son las vitaminas antioxidantes A, C y E y la vitamina B₁₂. A su vez, para ayudar a la instauración del sueño, mejorar su efectividad y duración, y disminuir los despertares nocturnos, incluye una cantidad más elevada de aquellos nutrientes que favorecen el inicio del sueño y que aumentan su duración, como es el caso del triptófano, precursor de la serotonina, melatonina y los hidratos de carbono, responsables de liberar insulina, capaz de activar la absorción del triptófano. Esta fórmula nocturna también incorpora, triglicéridos de cadena media y los nucleótidos uridina y adenosina (que favorecen un incremento de la duración total del sueño y una disminución de los periodos de vigilia). Igualmente, esta fórmula contiene otros compuestos de especial importancia en el desarrollo y maduración infantil como la taurina, carnitina, selenio y α -lactoalbúmina.

Cuando se combinan de esta manera todos los nutrientes, se favorece la correcta instauración de los ciclos de vigilia y sueño en los lactantes, consiguiendo resultados muy positivos ya publicados en diversos estudios [83]. Sin embargo aún quedan muchos componentes nutricionales que se encuentran en la leche humana y de los que no conocemos su ritmicidad circadiana de síntesis y secreción. Evidentemente, cuanto más consigamos conocer todo lo referente a la leche materna, mejor podremos diseñar las leches maternizadas, asemejándolas al patrón de referencia que es la leche de la madre.

Por este motivo en esta investigación se ha tratado de estudiar el ritmo circadiano de todos los nucleótidos presente en la leche materna y cuya importancia en el crecimiento del lactante es determinante [42], para tratar de asemejar las fórmulas artificiales lo máximo posible al patrón nutritivo de la leche humana. Es así como se espera poder nutrir correctamente a aquellos bebés que por unos motivos o por otros, no estén siendo alimentados con lactancia natural y/o que tengan desencarrilado el ciclo de sueño/vigilia.

El término “Crononutrición” está ganando popularidad con el paso de los años, y aunque se basa en la disciplina de la Cronobiología, la cual se inició hace más de dos siglos, es ahora cuando se está consolidando entre la población y está teniendo mayor fuerza y rigor científico.

Hablar del concepto de crononutrición es lo mismo que hablar de cronodieta. Esto es, una adaptación de la composición de los alimentos que ingerimos, a los biorritmos de nuestro organismo para una mejor

regulación de las funciones del cuerpo humano, pudiendo ser vital en la lucha contra patologías como la obesidad, cáncer o trastornos del sueño.

Asimismo, a través de una correcta administración de los alimentos (a una hora específica del día para su óptima absorción y utilización por el organismo), estaríamos proporcionando un sincronizador interno, el cual se combina a la perfección con el sincronizador externo que es la luz, para una adecuada coordinación de todos los sistemas fisiológicos.

En comparación con otros estudios realizados hasta el momento, que conozcamos, existen muy pocas publicaciones que se hayan centrado en los ritmos circadianos de los componentes nutricionales, y más aún si lo restringimos al campo de la leche materna.

Basándonos en una búsqueda con los descriptores científicos "circadian rhythm" y "milk, human" a través del Medical Subject Headings (MeSH), actualmente en la plataforma Pubmed/Medline podemos decir se encuentran reflejadas un total de 75 referencias científicas.

En un principio (década de los años 70), las investigaciones realizadas sobre las variaciones circadianas de los componentes de la leche materna no tenían como finalidad el conocimiento de los ritmos cronobiológicos, se centraban en hallar el momento del día en el cual ese componente era más representativo y así poder realizar un análisis eficaz de su concentración en este fluido.

Entre toda la bibliografía documentada, la mayoría de los estudios giran en torno a la fracción grasa de la leche materna, aunque aún no están aclarados todos los mecanismos de acción ya que estas

investigaciones son realizadas con un tamaño muestral bastante pequeño, lo que puede ser insuficiente para sacar conclusiones generales, aplicadas a toda la población.

Hoy día, contamos con numerosas herramientas que nos facilitan el trabajo en este campo, como es el uso de sistemas de análisis altamente eficaces (electroforesis capilar, HPLC, tándem masas, etc) combinados con programas de software específicos, con los cuales -mediante modelos matemáticos- obtenemos si una sustancia o parámetro fisiológico presenta o no ritmo circadiano.

Es por ello que dada la escasez de referencias con las cuales discutir nuestros datos, toda la información aportada con los mismos es un primer paso firme hacia futuros estudios sobre los efectos de la crononutrición en etapas tan tempranas como la lactancia.

Aunque la población de mujeres lactantes que ha participado en nuestros estudios ha sido adecuada, podemos destacar la gran heterogeneidad de los resultados encontrados. Así y tras analizar las dietas de todas las mujeres, se encontró un significativo déficit de algunos componentes nutricionales, y aunque hay gran disparidad entre los autores para ponerse de acuerdo si la ingesta de alimentos influye o no en la calidad de la leche materna, nuestros resultados muestran las variaciones en el contenido de los diferentes componentes nutricionales en dicho grupo concreto de mujeres.

El funcionamiento de la mama depende tanto de las estructuras anatómicas como de un perfecto sistema de regulación hormonal. Así, para una optimización de la síntesis de leche materna, se requiere del

completo vaciado del pecho, bien por el lactante como por parte de la madre. En el caso de nuestro estudio podemos aportar que dicho vaciado se realizaba tras la extracción de la leche por parte de las participantes.

Entre todas las hormonas que participan en la lactogénesis, es bien conocido como la prolactina tiene un marcado ritmo circadiano, el cual se incrementa durante el sueño. Gracias a su liberación pulsátil en respuesta a la succión del pezón, variable en número y duración a lo largo del día, se genera una mayor cantidad de dicha hormona durante la noche, aun habiendo más tomas diurnas.

Tal y como se esperaba, tras el análisis del contenido proteico y nitrógeno total en la leche materna, se observa un significativo descenso de la concentración de los mismos a medida que avanza la lactancia. No obstante, y como novedad, encontramos un aumento estadísticamente significativo en las muestras nocturnas frente a las del periodo diurno, durante la etapa madura.

Dicho incremento en las muestras del periodo nocturno, sobre todo en muestras pertenecientes a madres con lactancia instaurada y donde el periodo de tomas a lo largo del día se encuentra muy regulado y establecido de forma constante, podría deberse al balance energético de la madre y a su regulación hormonal a través de la lactancia, donde por ejemplo la leptina juega un papel determinante al disminuir sus niveles tras el periodo de lactancia, aumentando en modelo animal durante el periodo nocturno.

Así y tras lo anteriormente dicho, tales evidencias nos hicieron pensar en una posible variación circadiana en el contenido de aminoácidos.

Tras analizar 17 aminoácidos en todas las etapas de la lactancia, pudimos confirmar numerosas variaciones entre las diferentes horas del día, aunque no todos los aminoácidos presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Así, durante el periodo calostrado, el único aminoácido con un ritmo circadiano presente, es el triptófano, el cual mantiene dicho ritmo durante toda la lactancia, apoyando así la hipótesis de ser un compuesto que facilita la sincronización del reloj biológico del lactante.

Con el avance de los días, la leche materna varía los niveles de sus nutrientes, y es así como en la etapa transicional junto al triptófano, la metionina muestra un ritmo circadiano, el cual (tal y como sucede con el triptófano calostrado) se mantiene durante la etapa madura. Dicho efecto de ambas sustancias (implicadas en la inducción del sueño y de la vigilia respectivamente), puede resultar beneficioso para el lactante, que poco a poco va adaptándose al ambiente que le rodea.

Finalmente en la etapa madura junto a los dos anteriores aminoácidos, se encontraron otros que mostraban un ritmo circadiano: ácido aspártico, histidina, fenilalanina, tirosina.

Dichos datos sobre el triptófano en leche materna concuerdan con los obtenidos por Cubero y cols. [57, 80, 81, 82 y 83]. Sin embargo, estos nuevos resultados, aportarían claras evidencias de una actuación "sincronizadora" por parte de este aminoácido desde el inicio de la lactancia (leche calostrada, 1-5 días postparto) hasta el final de la misma,

lo cual pone de manifiesto la importancia que puede tener que el recién nacido perciba la leche materna a la hora en la cual fue extraída, para la instauración del ritmo sueño/vigilia.

Con respecto al resto de aminoácidos, la metionina es otro de los que presentan un ritmo circadiano en el inicio de la lactancia (etapa de transición en adelante).

Es precursor de cisteína (esencial para los neonatos) y poliaminas, además de participar en la síntesis de acetilcolina. Favorece su aumento plasmático en el recién nacido, la cual afecta al sistema de defensa antioxidante celular, al desarrollo del sistema digestivo y ayudaría al mantenimiento de la vigilia durante las horas diurnas (formación de acetilcolina). [84]

Tal y como se observa en nuestros resultados, es en la etapa madura cuando la mayoría de las sustancias muestran su carácter circadiano.

El ácido aspártico, junto con el glutamato y la glicina son los únicos aminoácidos que además son neurotransmisores (excitatorios). De nuestro estudio se entiende que al menos el ácido aspártico muestra un ritmo circadiano estadísticamente significativo. Dicho aminoácido puede atravesar la barrera hematoencefálica y actuar en el SNC. [85]

Fenilalanina y tirosina son dos aminoácidos esenciales, siendo el 2º de ellos precursor de las catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina), neurohormonas que participan activamente en la instauración de la vigilia. Nuestros resultados apoyan dicha función, ya que al mostrar un ritmo circadiano con acrofase diurna, estaría indicando

una mayor presencia de los mismos durante las horas de luz, proporcionando al neonato las neurohormonas necesarias para la vigilia.

En el caso de la histidina, aminoácido semiesencial y precursor del neurotransmisor histamina (de efecto postsináptico excitador), muestra un ritmo circadiano con acrofase nocturna durante la etapa madura de la leche materna. Al ser un aminoácido semiesencial, hay que tener en cuenta que su concentración en el organismo no viene condicionada exclusivamente por la dieta. Por tanto, y aunque hayamos valorado en la leche materna su acrofase, no podemos concluir con total rigurosidad si esta sustancia interviene en el sueño o en la vigilia, dejándose así una puerta abierta en la cronobiología de la histidina e histamina.

Tras las evidentes variaciones circadianas encontradas en los componentes nitrogenados, se decidió analizar otros componentes de la leche materna, concretamente aquellos de la fracción nitrogenada no proteica (NNP), como es el caso de los nucleótidos.

Podemos señalar diferentes estudios que indican que los nucleótidos uridina 5'monofosfato [86, 87 y 88], adenosina 5'monofosfato [89, 90, 91 y 92] se encuentran implicados en la regulación del sueño/vigilia, lo cual concuerda con lo mostrado para estas sustancias en dicha tesis.

Después de todos los análisis realizados, y aunque no podemos asegurar la influencia de la dieta materna en la composición de la leche, tal y como se observan en los resultados, hallamos diferencias significativas en la actividad total de antioxidantes. Así, se observa un incremento estadísticamente significativo en los niveles al inicio del periodo nocturno frente al resto.



5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos propuestos en esta tesis, se puede concluir:

5.1 Del análisis del nitrógeno total y las proteínas por el método Kjeldahl podemos concluir:

- *Los resultados del análisis de nitrógeno total y proteínas en leche humana se asemejan a los obtenidos por otros autores.*
- *Se observa una significativa disminución del nitrógeno total, así como de las proteínas durante el desarrollo de la lactancia.*
- *No se han observado cambios estadísticamente significativos día-noche durante las etapas de calostro y transición, sin embargo sí los hubo durante la etapa madura de la leche materna.*

5.2 Del análisis cuantitativo de los aminoácidos por tándem masas se concluye que:

- *Se ha conseguido desarrollar un método rápido y apto para el análisis de los aminoácidos en leche materna mediante tecnología tándem masas.*

- *Podemos observar cómo desde primera la toma de leche del recién nacido, el aminoácido esencial triptófano ya presenta un ritmo circadiano, el cual se mantiene durante todas las etapas de la lactancia.*
- *Durante la etapa calostrada se ha demostrado que el aminoácido esencial triptófano en leche humana tiene un marcado ritmo circadiano, con su acrofase durante el periodo nocturno, a excepción del resto de aminoácidos en los que no aparecen cambios día/noche.*
- *Durante la etapa de transición, se ha observado que en la leche materna los aminoácidos esenciales triptófano y metionina tienen un marcado ritmo circadiano con acrofases en el periodo nocturno para el triptófano y durante el periodo diurno para la metionina.*
- *Durante la etapa madura de la leche materna, hay numerosos aminoácidos con variaciones circadianas: triptófano, ácido aspártico, histidina, metionina, fenilalanina y tirosina.*
- *El triptófano y la histidina presentan ritmos circadianos durante la etapa de la leche madura, con su acrofase durante el periodo nocturno.*
- *Los aminoácidos excitadores que poseen ritmo circadiano en la leche madura con acrofase durante el periodo diurno son: ácido aspártico, metionina, fenilalanina y tirosina.*
- *Se puede observar una tendencia de la leche materna a encarrilar un ritmo circadiano en el recién nacido a partir de sus componentes a medida que avanza la lactancia, ya que es*

durante esta etapa madura cuando más aminoácidos muestran variaciones circadianas.

5.3 Del análisis cuantitativo de los nucleótidos por Electroforesis Capilar, se concluye que:

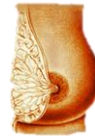
- *Los nucleótidos son componentes importantes en el desarrollo del lactante y la Electroforesis Capilar es una herramienta de alta sensibilidad y eficaz para el análisis de estas sustancias en leche humana.*
- *Los niveles más elevados de 5'AMP, 5'GMP and 5'UMP en leche madura durante el periodo nocturno, puede indicar que estos componentes podrían inducir la acción hipnótica del recién nacido durante la noche.*

5.4 Análisis cuantitativo de la capacidad antioxidante por el método TEAC podemos concluir que:

- *Hay un ligero aumento de la capacidad antioxidante en las muestras de leche calostrual del periodo nocturno frente a las del periodo diurno, probablemente como resultado de la actividad inmunológica de la madre y así como la ingesta de vitaminas y proteínas durante el día.*

Teniendo en cuenta los resultados finales, se puede indicar que la manipulación de los componentes de la dieta, administrados durante los primeros días de vida del neonato podría ayudar a consolidar el ritmo circadiano en el recién nacido.

La leche materna debería ser administrada al bebé a la misma hora en la cual fue extraída del pecho. Así, el neonato podría ajustar su patrón circadiano en armonía con el entorno (día / noche), el cual es crucial para un correcto funcionamiento y sincronización de todos los sistemas del cuerpo humano.



5. CONCLUSIONS

According to the objectives proposed in this thesis, it can be concluded:

5.1 Analysis of total nitrogen and protein by the Kjeldahl method in human milk can conclude:

- *The results of the analysis of total nitrogen and protein in human milk are similar to those obtained by other authors.*
- *There is a significant decrease in total nitrogen and proteins during development of lactation.*
- *No statistically significant changes were observed during day-night period in the colostrum and transitional stage, however during the mature stage of breast milk there were differences between day and night period.*

5.2 Quantitative analysis of amino acids by tandem mass concludes:

- *It has managed to develop a fast and suitable method for analysis of amino acids in breast milk by tandem mass technology.*

- *It has showed how from the first milk feed the newborn, the essential amino acid tryptophan and has a circadian rhythm, which is maintained during all stages of lactation.*
- *During colostral stage, it is demonstrate that in the breast milk, the tryptophan, an essential amino acid, was the only one which showed a significant circadian rhythm, its acrophase was during the night period.*
- *During transitional stage, there are two amino acids in the breast milk with a circadian rhythm: tryptophan and methionine. The first one has its acrophase during the night period; however the second one has its acrophase during the diurnal period.*
- *During the mature stage, there are several amino acids with circadian variations: tryptophan, aspartic acid, histidine, methionine, phenylalanine and tyrosine.*
- *Tryptophan and histidine have a circadian rhythm during the mature stage with an acrophase in the night period.*
- *Some excitatory amino acids with a circadian rhythm have a circadian rhythm in the mature milk with an acrophase during the diurnal period: aspartic acid, methionine, phenylalanine and tyrosine.*
- *There is a tendency of breast milk on synchronize a circadian rhythm in the newborn from its components as lactation advances, as it is during this mature stage, when more amino acids show circadian variations.*

5.3 Quantitative analysis of nucleotides by capillary electrophoresis:

- *Nucleotides are important components in infant development, and capillary electrophoresis is a tool of high sensitivity and efficiency for the analysis of these compounds in breast milk.*
- *Increased nocturnal levels 5'AMP, 5'GMP and 5'UMP in mature breast milk, may be involved in the induction of the hypnotic action of the infant during the night.*

5.4 Quantitative analysis of antioxidant capacity by TEAC method:

- *There is a slight increase in antioxidant capacity in colostrum breast milk samples of the nocturnal period compared to other samples of the diurnal period, probably as a result of maternal immunological activity and the contribution in their intake of vitamins and proteins made throughout the day.*

Taking together the final results, it follows that the manipulation of the dietary constituents administered during the first days of life can aid to consolidate the circadian rhythm in the neonate.

Breast milk should be given to the baby at the same time of day it is expressed. Thus, the baby would be adjusting his circadian pattern in harmony with his environment (day / night), crucial for the proper functioning and synchronization of all systems in the human body.



6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Berger, R.L. *When should one discourage breastfeeding. Pediatrics*, 67:300-302, 1981.
- [2] Robinson, V. *The Store of Medicine*. New York: New Home Library, 1943.
- [3] Talbot, C.H. *Medicine in Medieval England*. London: Osbourne Book Co. Ltd. 1967.
- [4] Schwab, M.G. *The rise and fall of the baby's bottle. J Hum Nutr*, 33(4):276-282, 1979.
- [5] Fildes, V. *The Elisabethan wet nurse. Nurs. Times*, 74(11):472-473, 1978.
- [6] Prince, J. *Infant feeding through the ages. Midwives Chron*, 89(1067):283-285, 1976.
- [7] *The neonate: A day in the life of a wet nurse. Nurs Mirror*, 148(2):14-15, 1979.
- [8] *Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría. Informe Técnico sobre la lactancia materna en España. An Esp Pediatr*, 50:333-340, 1999.
- [9] García-Vera, C. y Martín-Calama, J. *Lactancia materna en España. Resultado de una encuesta de ámbito estatal. RPAP*, II(7):21-35, 2000.

-
- [10] Neville, M.C. *Regulation of mammary development and lactation. Physiology, nutrition and breast-feeding*. Plenum Press, New York. Pág. 103-140, 1983.
- [11] Cregan, M.D. y Hartman, P.E. *Computerized breast measurement from conception to weaning: clinical implications*, *J Hum Lact*, 15(2):89, 1999.
- [12] Kulsí, J.K. y Hartmann, P.E. *Changes in human milk composition during the initiation of lactation*. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 59:101-114, 1981.
- [13] Woolridge, M.W., Greasley, V. y Silpisornkosol, S. *The initiation of lactation: The effect of early versus delayed contact for suckling on milk intake in the first week post-partum. A study in Chiang Mai, Northern Thailand*. *Early Hum. Dev*, 12:269-278, 1985.
- [14] Egli, G.E., Egli, N.S. y Newton, H. *Influence of the number of breastfeedings on milk production*. *Pediatrics*, 26:314-317, 1961.
- [15] Neifert, M.R., McDonough, S.L. y Neville M.C. *Failure of lactogenesis associated with placental retention*. *Am J Obstetr Gynecol*, 140:447, 1981.
- [16] Hambraeus, L., Lönnerdal, B., Forsum, E. y cols. *Nitrogen and protein components of human milk*. *Acta Paedriatr Scand*, 67:561-565, 1978.
- [17] Jellife, D.B. y Jellife, E.F.P. *Human milk in the modern world. Psychological, nutrition and economic significance*. Oxford University Press, Oxford. 1978.
- [18] Hayden, T.J., Bonney, R.C. y Forsyth J.A. *Ontogeny and control of prolactin receptors in the mammary gland and liver on virgin, pregnant and lactating rats*. *J Endocrinol*, 80:259, 1979.

-
- [19] Fuchs A. *Physiology and endocrinology of lactation. Obstetrics. Normal and problem pregnancies, New York. Pág. 549, 1986.*
- [20] Sowers J.R., Hershman J.M., Carlson H.E. y cols. *Prolactin response N3-methyl-thyrotropine releasing hormone in euthyroid subjects. J Clin Endocrinol Metab, 43:749-755, 1976.*
- [21] Rivier C., Vale W., Ling N. y cols. *Stimulations in vivo of the secretion of prolactin and growth hormone by B-endorphin. Endocrinology, 100:238-241, 1977.*
- [22] Findlay A.L.R. *Neural and behavioural interactions with lactation. Falconer J.R. Lactation, Butterworths, London, 1971.*
- [23] Uvnäs-Moberg K. y Eriksson M. *Breastfeeding: Physiological, endocrine and behavioural adaptations caused by oxytocin and local neurogenic activity in the nipple and mammary gland. Acta Paediatr, 85:525-530, 1995.*
- [24] Baumann, U. *Motivation, technik und resultate des stillens. Ther Umsch, 35:603-609, 1978.*
- [25] Uvnäs-Moberg, K., Widström, A.M., Nissen, E. y cols. *Personality traits in women 4 day postpartum and their correlation with plasma levels of oxytocin and prolactin. J Psychosom Obstetr Gynaecol, 11:261-263, 1990.*
- [26] Vis, H.L., Hennart, P. y Robyn, C. *The frequency of suckling in breastfeeding and the effect on lactation and fertility. Bull International Pediatric Association, 5:36-45, 1983.*
- [27] Lizuka, T., Sasaki, M., Oishi, K. y cols. *Nitric oxide may trigger lactation in humans. J Pediatr, 131:839-843, 1997.*

-
- [28] Walsh, C., Neville, M.C. *Effect of xenobiotics on milk secretion and composition. J Nutr Biochem*, 5:418-441, 1994.
- [29] Neville, M.C. *Lactogenesis. Pediatr Clin Nort. Am, (ed. esp.)* 1:13-34, 2001.
- [30] Lawrence, R.A. *La lactancia materna. Una guía para la profesión médica. 4º ed. Mosby/Doyma, Madrid.1996.*
- [31] Hartmann, P.E. y Prosser, C.G. *Acute changes in the composition of milk during ovulatory menstrual cycle in lactating women. J Physiol*, 324:24-30, 1982.
- [32] Dagnelie, P.C., Van Staveren, W.A., Roos, A.H. y cols. *Nutrients and contaminants in human milk from mothers on macrobiotic abd omnivorous diets. Eur J Clin Nutr*, 46:355-366, 1992.
- [33] Harzer, G., Dieterich, I. y Haug, M. *Effects of diet on the composition of human milk. Ann Nutr Metab*, 28:231-239, 1984.
- [34] Heird, W.C., Swcharz, S.M. y Hansen, I.H. *Colostrum-induced enteric mucosal growth in Beagle puppies. Pediatr Res*, 18:512-515, 1984.
- [35] Lönnerdal, B., Woodhouse, L.R. y Glazier, C. *Compartmentalitation and quantitation of protein in human milk. J Nutr*, 117:1385-1395, 1987.
- [36] Lönnerdal, B., Atkinson, S. *Nitrogenous components of milk. Human milk proteins. Jensen R.G. (ed) Handbook of milk composition. Academic Press, San Diego. Pág. 345-368, 1995.*
- [37] Kunz, C., Lönnerdal, B. *Reevaluation of the key protein/casein ratio of human milk from Sweedish well-nourished mothers. Am J Clin Nutr*, 29:1127-1133, 1976.

-
- [38] Lönnerdal, B., Forsum, E., Hambraeus, L. 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, 1976.
- [39] Sánchez-Pozo, A., Rueda, R., Fontana, L. y cols. Dietary nucleotides and cell growth. *Trends of Comparative Biochem & Physiol*, 5:99-111, 1998
- [40] Carver, J. Dietary nucleotides: cellular immune, intestinal and hepatic system effect. *J Nutr*, 129(suppl):144-148, 1994.
- [41] Uauy, R., Stringel, G., Thomas, R., y cols. Effects of nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 10:497-503, 1990.
- [42] Gil, A., Sánchez-Medina, F. Acid-soluble nucleotides of human milk at different stages of lactation. *J Dairy Res*, 49:301-307, 1982.
- [43] Hasegawa T, Azum S, Inoué S. Amino acid release from the rat oral pontine reticular nucleus across the sleep-wakefulness cycle. *J Med Dent Sci*, 47(1):87-93, 2000.
- [44] File SE, Fluck E, Fernandes C. Beneficial effects of glycine (bioglycin) on memory and attention in young and middle-aged adults. *J Clin Psychopharmacol*, 19(6):506-512, 1999.
- [45] Clark RM, Ross SA, Hill DW, Ferris AM. Within-day variation of taurine and other nitrogen substances in human milk. *J Dairy Sci*, 70(4):776-80, 1987
- [46] Sugawara, M, Sato N, Nakato T, Idota T, Nakajima I: Profile of nucleotides and nucleosides of human milk. *J Nutr Sci Vitaminol*, 41:409– 418, 1995.

-
- [47] Perrin, C, Meyer L, Mujahid C, Blake C: *The analysis of 5'-mononucleotides in infant formulae by HPLC. Food Chem, 74:245–253, 2001.*
- [48] Gil, A., Rueda, R. *Modulation of intestinal microflora by specific dietary components. Microb Ecol Health Dis, 12(1):31-39, 2000.*
- [49] Hasmosh, M. *Lipid metabolism in premature infants. Biol Neonate, 52:50-64, 1987.*
- [50] François, C.A., Connor, S.L, Wander, R.C. y cols. *Acute effect of dietary fatty acids on the fatty acids of human milk. Am J Clin Nutr, 67:301-308, 1998.*
- [51] Temboury, M.C. *Componentes de la leche materna. Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría (AEP). Ediciones Ergon. Lactancia Materna: Guía para profesionales. Monografía de la AEP nº 5 primera edición: 2004.*
- [52] Lavie, P. *Two 19th-century chronobiologists: Thomas Laycock & Edward Smith by P. Lavie. Chronobiol Internat, 9:83-96, 1992.*
- [53] Minors, D.S. *Comment: Two 19th-century chronobiologists: Thomas Laycock & Edward Smith by P. Lavie. Chronobiol Internat, 9:97-99, 1992.*
- [54] Golembek, D. *Cronobiología, la máquina del tiempo. www.cientec.or.cr/exploraciones/ponencias2006/DiegoGolombek.pdf 2006.*
- [55] Madrid, J.A. *Los relojes de la vida. Una introducción a la cronobiología. Madrid, J.A y Rol de Lama, A. Cronobiología básica y clínica. Ed. Editec. 2006.*
- [56] Heine, W.E. *The Significance of Tryptophan in infant nutrition. Tryptophan, Serotonin and Melatonin: Basic Aspects and applications. Edit. Haether et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. 1999.*

-
- [57] Cubero, J. *Tesis Doctoral: Triptófano, melatonina y ritmos de actividad/inactividad en animales diurnos y niños lactantes. Fagocitosis y metabolismo oxidativo. Universidad de Extremadura. 2004.*
- [58] Maestroni, G.J.M. *The immunoendocrine role of melatonin. J Pineal Res, 14:121-126, 1993.*
- [59] Brezezinski, A. *Melatonin in humans. New England J Med, 336:186-195, 1997.*
- [60] Kunz, D., Mahlberg, R., Müller, C., Tilmann, A., Bes, F. *Melatonin in patients with reduced REM sleep duration: two randomized controlled trials. J Clin Endocrinol Metab, 89:128-134, 2004.*
- [61] Rodríguez, A.B., Marchena, J.M., Nogales, G., Durán, J., Barriga, C. *Correlation between circadian rhythm of melatonin and superoxide anion in levels in ring dove heterophils. J Pineal Res, 26: 35-42, 1999.*
- [62] Rodríguez, A.B., Nogales, G., Marchena, J.M., Ortega, E., Barriga, C. *Supresión of both basal and antigen-induced lipid peroxidation in ring dove heterophils by melatonin. Biochem Pharmacol, 58:1301-1306, 1999.*
- [63] Lien, E.L. *Infant formulas with increased concentrations of α -lactoalbumin. Am J Clin Nutr, 77:1555-1558, 2003.*
- [64] Sulkers, E.J., Lafeber, H.N., Sauer, J.J. *Quantization of oxidation of medium-chain triglycerides in preterm infants. Pediatr Res, 26:294-297, 1989.*
- [65] Bach, A.C., Babayan, V.K. *Medium-chain triglycerides: an update. Am J Clin Nutr, 36:950-962, 1982.*

- [66] Telliez, F., Bach, V., Leke et al. Feeding behaviour in neonates whose diet contains medium-chain triacylglycerols, Short term effects on thermoregulation and sleep. *Am J Clin Nutr*, 76(5):1091-1095, 2002.
- [67] Lyons, P.M., Truswell, A.S. Serotonin precursor influenced by a type of carbohydrate meal in healthy adults. *Am J. Clin Nutr*, 47:433-439, 1988.
- [68] Wurtman, R.J., Wurtman, J.J., Regan, M.M., McDermott, J.M., Tsay, R.H., Breu, J.J., Effects of normal meals rich in carbohydrates or proteins on plasma tryptophan and tyrosine ratios. *Am J Clin Nutr*. 77:128-132, 2003.
- [69] Schaechter, J.D., Wurtman, R.J. Serotonin release varies with brain tryptophan levels. *Brain Res*, 532:203-210, 1990.
- [70] Okawa, M., Mishima, K., Nanami, T., Shimizu, T., Iijima, S., Hishikawa, Y., Takahashi, K. Vitamin B₁₂ treatment for sleep-wake disorders. *Sleep*. 13:15-23, 1990.
- [71] Haas, H.L., Sergeeva, O.A, Selbach, O. Histamine in the Nervous System. *Physiol Rev* 88:1182-1241, 2008.
- [72] Laloux C, Derambure P, Jacquesson JM, Bordet R, Destée A, Monaca C. The effects of serotonergic, noradrenergic, cholinergic and dopaminergic drugs on vigilance states in MPTP-treated mice. *Brain Res*, 1161:79-87, 2007.
- [73] Tsai PJ, Wu WH, Huang PC. Circadian variations in plasma neutral and basic amino acid concentrations in young men on an ordinary Taiwanese diet. *J Formos Med Assoc*, 99(2):151-157, 2000.
- [74] Agrimonti, F., Frairia, R., Fornaro, D. Torta, M., Borretta, G., Trapani, G., Bertino, E., Angeli, A. Circadian and circaseptan rhythmicities in

- corticosteroid-binding globulin (CBG) binding activity of human milk. Chronobiologia, 9(3):281-290. 1982.*
- [75] Keenan, B.S., Buzek, S.W., Garza, C., Potts, E., Nichols, B.L. Diurnal and longitudinal variations in human milk sodium and potassium: implication for nutrition and physiology. *Am J Clin Nutr, 35(3):527-534. 1982.*
- [76] Hurgoiu, V., Marcu, A., Sopon, E., Olariu, M. Dynamics of the composition of lipids in human milk during lactation. *Pediatric, 40(3):201-205. 1985.*
- [77] Stafford, J., Villalpando, S., Urquieta, Aguila, B. Circadian variation and changes after a meal in volume and lipid production of human milk from rural Mexican women. *Ann Nutr Metab, 38(4):232-237. 1994.*
- [78] Picciano, M.F., Guthrie, H.A. Copper, iron and zinc contents of mature human milk. *Am J Clin Nutr, 29:242-254. 1976.*
- [79] Viverge, D., Grimmonprez, L., Cassanas, G., Bardet, L., Solère, M. Diurnal variations and within the feed in lactose and oligosaccharides of human milk. *Ann Nutr Metab, 30(3):196-209. 1986.*
- [80] Cubero, J., Valero, V., Sánchez, J., Rivero, M., Párvez, H., Rodríguez, A.B., Barriga, C. The circadian rhythm of tryptophan in breast milk affects the rhythms of 6-sulfatoxymelatonin and sleep in newborn. *Neuro Endocrinol Lett, 26(6):657-661. 2005.*
- [81] Cubero, J., Valero, V., Narciso, D., Rivero, M., Marchena, J.M., Rodríguez, A.B., Barriga, C. L-tryptophan administered orally at night modifies the melatonin plasma levels, phagocytosis and oxidative metabolism of ringdove (*Streptopelia roseogrisea*) heterophils. *Mol Cell Biochem, 293(1-2):79-85. 2006.*

- [82] Cubero, J., Narciso, D., Terrón, P., Rial, R., Esteban, S., Rivero, M., Parvez, H., Rodríguez, A.B., Barriga, C. Chrononutrition applied to formula milks to consolidate infants' sleep/wake cycle. *Neuro Endocrinol Lett*, 28(4):360-366. 2007.
- [83] Cubero, J., Chanclón, B., Sánchez, S., Rivero, M., Rodríguez, A.B., Barriga, C. Improving the quality of infant sleep through the inclusion at supper of cereals enriched with tryptophan, adenosine-5'-phosphate, and uridine-5'-phosphate. *Nutr Neurosci*, 12(6):272-280. 2009.
- [84] Fontana, L., Sáez, M.J., Santisteban, R., Gil, A. Compuestos nitrogenados de interés en nutrición clínica. *Nutr Hosp*, 21(2):15-29. 2006.
- [85] Ray, B., Mallick, H.N., Kumar V.M. Changes in sleep-wakefulness in the medial preoptic area lesioned rats: role of thermal preference. *Behav Brain Res*, 158:43-52. 2005.
- [86] Kimura, T., Ho, I.K., Tamamoto, I. Uridine receptor: discovery and its involvement in sleep mechanism. *Sleep*. 24:251-260. 2001.
- [87] El Kouni, M.H., Naguib, F.N., Park, K.S., Cha, S., Darnowski, J.W., Soon, S.J. Circadian rhythm of hepatic uridine phosphorylase activity and plasma concentration of uridine in mice. *Biochem Pharmacol*, 40(11): 2479-2485. 1990.
- [88] Inoué, S. Sleep-promoting substance (SPS) and physiological sleep regulation. *Zoolog Sci*, 10(4):557-576. 1993.
- [89] Gallopin, T., Fort, P., Eggermann, E., Cauli, B., Luppi, P.H., Rossier, J., Audinat, E., Muhlethaler, M., Serafin, M. Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature*, 404(6781):992-995. 2000.

- [90] Morairty, S., Rainnie, D., McCarley, R., Greene, R. Disinhibition of ventrolateral preoptic area sleep-active neurons by adenosine: a new mechanism for sleep promotion. *Neuroscience*, 123(2):451-457. 2004.
- [91] Rivkees, S.A., Zhao, Z., Porter, G., Turner, C. Influences of adenosine on the fetus and newborn. *Mol Genet Metab*, 74(1-2):160-171. 2001.
- [92] Hunter, C.J., Bennet, L., Power, G.G., Roelfsema, V., Blood, A.B., Quaedackers, J.S., George, S., Guan, J., Gunn, A.J. Key neuroprotective role for endogenous adenosine A1 receptor activation during asphyxia in the fetal sheep. *Stroke*, 34(9):2240-2245. 2003.