





**LAS CASEÍNAS DE LA LECHE.  
ASPECTOS COMPARATIVOS**



FRANCISCO M. FERNÁNDEZ  
MARCELA HERNÁNDEZ DE SÁNCHEZ

Con la colaboración de  
GRACIELA RUIZ DE BIGLIARDO

LAS CASEÍNAS DE LA LECHE.  
ASPECTOS COMPARATIVOS



Fundación Miguel Lillo

OPERA LILLOANA

Serie monográfica que incluye trabajos originales de investigación sobre temas de botánica, geología y zoología.

ISSN 950-668-010-8

Fernández, Francisco M. y Hernández de Sánchez, Marcela.- LAS CASEÍNAS DE LA LECHE. ASPECTOS COMPARATIVOS

© FUNDACIÓN MIGUEL LILLO, 2009. Todos los derechos reservados.

Miguel Lillo 251

(T4000JFE) San Miguel de Tucumán

Argentina

Telefax +54 381 433 0868

Publicación indexada en *Latindex*, *Biological Abstracts*, *Zoological Record*, *Periodica* (México), *Biosis Reviews*, *Cambridge Scientific Abstracts*, *CAB Abstracts* (CABI UK)

Canje:

Centro de Información Geo-Biológico del Noroeste Argentino,

Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251,

(T4000JFE) San Miguel de Tucumán, Argentina.

Diseño y edición gráfica: Gustavo Sánchez.

Prohibida su reproducción total o parcial.

Impreso en la Argentina

*Printed in Argentina*

## RESUMEN

Este trabajo monográfico es una revisión de los aspectos biológicos más salientes de la estructura y función de las caseínas lácteas. Se describen los procesos evolutivos que habrían acaecido desde los Cynodontes a los mamíferos placentarios actuales. Asimismo se detallan las variaciones interespecífica e intraespecíficas que se encuentran en estas proteínas, como así también los mecanismos regulatorios que determinan su expresión en la leche.

*Palabras clave:* Proteínas lácteas; caseínas; lactación; evolución de mamíferos; ganado lechero.

## ABSTRACT

This monographic work constitutes a review of the most relevant biological characteristics of the structure and function of milk caseins. The evolutionary processes from the Cynodonts to present-day placental mammals are described. Moreover, interspecific and intraspecific variations found in these proteins are also presented, as well as the regulatory mechanisms that determine their expression in milk.

*Keywords:* Milk proteins; caseins; lactation; mammalian evolution; dairy breeds.



# Índice

---

Resumen / Abstract .....	7
Prefacio .....	13

— PRIMERA PARTE —  
GENERALIDADES SOBRE LA LACTACIÓN  
Y LOS COMPONENTES LÁCTEOS

Generalidades sobre la lactación .....	17
Las proteínas de la leche .....	20
Los componentes lipídicos de la leche .....	24
Los glúcidos de la leche .....	27
Distribución en compartimientos .....	30
Diferencias interespecíficas en la composición de la leche ..	31
Aislamiento y tecnología .....	33

— SEGUNDA PARTE —  
ORIGEN, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN  
DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS

Las proteínas del lactosuero .....	37
$\alpha$ -Lactalbúmina .....	38
$\beta$ -Lactoglobulina .....	39
Proteína ácida del suero (WAP) .....	40
Lactoferrina (Lf) .....	42
Inmunoglobulinas .....	44
Lisozima .....	46
La lactoforina o Componente 3 de las proteosas peptonas ....	48

Las caseínas .....	49
Los polímeros de caseínas .....	52
Las micelas de caseína .....	55
Las micelas y los polímeros de caseína .....	60
Acerca de las estructuras primarias y secundarias de las caseínas y de sus asociaciones .....	61

— TERCERA PARTE —  
LA EVOLUCIÓN DE LA LACTACIÓN

La evolución de la lactación .....	67
Origen de la glándula mamaria .....	73
Evolución de las caseínas .....	73
Origen de las caseínas calcio-sensibles .....	75
Origen de la $\kappa$ -caseína .....	80

— CUARTA PARTE —  
SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS

La dependencia hormonal .....	81
Mamogénesis .....	85
Lactogénesis .....	86
Las hormonas reguladoras .....	87
<i>Progesterona</i> .....	87
<i>Estrógenos</i> .....	88
<i>Prolactina</i> .....	89
<i>Somatotropina</i> .....	91
<i>Lactógenos placentario</i> .....	92
<i>Glucocorticoides</i> .....	93
<i>Hormonas tiroideas</i> .....	94
<i>Insulina</i> .....	94
<i>Inhibidor de Lactación por Retroalimentación (FIL)</i> .....	95
<i>Leptina</i> .....	95
Los Factores de crecimiento .....	97
<i>Los factores de crecimiento insulinoideos</i> .....	97
<i>Los factores de crecimiento epidermal</i> .....	98
<i>Los factores de crecimiento de fibroblasto</i> .....	98
<i>Los factores de crecimiento transformantes <math>\beta</math></i> .....	99
La influencia de las proteínas de la matriz extracelular ....	99

<i>La transcripción y los genes de las principales proteínas lácteas</i> .....	100
<i>El RNA mensajero</i> .....	101
<i>Regulación endócrina de la transcripción en la síntesis de proteínas lácteas</i> .....	102
<i>Influencia endócrina sobre la traducción en la síntesis de proteínas lácteas</i> .....	103

— QUINTA PARTE —  
 LOS OLIGÓMEROS DE CASEÍNAS  
 Y LAS PROTEÍNAS MICELARES ASOCIADAS

Los oligómeros de caseínas y las proteínas micelares asociadas .....	107
Corzuela parda ( <i>Mazama gouazoubira</i> ) .....	112
Venado de las pampas ( <i>Ozotocerus bezoarticus</i> ) .....	113
Tapir ( <i>Tapirus terrestris</i> ) .....	114
Elefante marino ( <i>Mirounga leonina</i> ) .....	115
Lobo marino ( <i>Otaria flavescens</i> ) .....	116
Armadillo ( <i>Chaetophractus vellerosus</i> ) .....	116
Mono caí ( <i>Cebus apella</i> ) .....	117
Ciervo europeo ( <i>Dama dama</i> ) .....	118
Llama ( <i>Lama glama</i> ) .....	118
Alpaca ( <i>Lama pacos</i> ) .....	119
Cabra ( <i>Capra hircus</i> ) .....	120
<i>Homo sapiens</i> .....	121
Oso hormiguero ( <i>Myrmecophaga tridactyla</i> ) .....	122
Proteínas asociadas con las micelas de caseínas de las especies estudiadas .....	123
El papel de la k-caseína .....	124
La separación por cromatografía de partición .....	125
Glicosilación de las caseínas de las diferentes especies ....	125
Aspectos comparativos de los oligómeros y las proteínas micelares asociadas .....	127
Composición de oligómeros de caseínas presentes en las diferentes especies .....	128
Actividad protectora de estructuras proteicas presente en el lactosuero .....	133
Glicosilación de las caseínas y proteínas asociadas a las micelas .....	134

Caseínas monoméricas de las distintas especies .....	138
Proteínas asociadas a las micelas de caseína .....	139

— SEXTA PARTE —  
LAS VARIACIONES EN LAS CASEÍNAS

*Por Graciela Ruiz de Bigliardo*

El proceso de secreción de las proteínas lácteas .....	141
Acerca de la variabilidad intraespecífica de las caseínas ...	142
Acerca de la estructura genética de las caseínas .....	146
La $\alpha_{s1}$ -caseína .....	150
La $\alpha_{s2}$ -caseína .....	156
La $\beta$ -caseína .....	157
La $\kappa$ -caseína .....	160
Bibliografía .....	163

# Prefacio

---

**L**as caseínas conforman el grupo más conspicuo de proteínas que llevan a cabo una función concreta en la alimentación de las crías en el reino animal. Nos ha parecido necesario dar forma a una publicación que englobe los aspectos más salientes de los orígenes, evolución, funciones, estructura, síntesis y polimorfismos de las caseínas, con la idea que sea de utilidad para biólogos e ingenieros zootecnistas que se interesan por el tema de la lactación y la alimentación neonatal.

En los aspectos comparativos de este tema la evolución es importante y tratándose de proteínas existen conceptos suficientemente aceptados que conviene adelantarlos porque están implícitos en la mayor parte de las hipótesis que explican los hechos asociados a la evolución de las caseínas. Gran parte de la evolución de las funciones de los organismos vivos se basa en la diversificación de una función básica de forma tal que ésta da lugar a una nueva la cual coexiste, y en algunos casos interactúa con la primera. Cuando se trata del nivel molecular un nuevo mecanismo que corresponde a la función de una estructura se origina en la aparición de una nueva proteína. El proceso empieza con la duplicación génica de un gen ancestral y la posterior mutación del nuevo gen de forma tal que la nueva proteína llega a tener una función distinta a la original. De manera que el estudio comparativo actual recapitula a grandes rasgos la historia de la diversificación. De los dos grupos más importantes de proteínas presentes en la secreción láctea de los mamíferos, las caseínas conforman el conjunto más homogéneo tanto desde el punto de vista de su estructura como en lo relacionado con su función.

Las caseínas, si bien tienen funciones de nutrición en forma casi excluyente, muestran varias facetas distintas: la literatura

abunda en información acerca de efectos de tipo nervioso, hormonales, cardiovasculares, por nombrar los más citados, que poseen los péptidos derivados de la hidrólisis de estas proteínas. Gran parte de esta información se origina en datos obtenidos en animales de laboratorio y otro tanto en estadísticos-epidemiológicos.

Probablemente sea necesario e ineludible hacer referencia a varios componentes de este tema que entrañan hechos, mecanismos y situaciones que no están completamente resueltos, obviamente por falta de información precisa. Parte del problema radica en el hecho que existen numerosas características atribuidas a las caseínas, las cuales no han sido hasta ahora comprobadas en la generalidad de las especies de mamíferos. Es interesante mencionar que no solamente la información existente es incompleta, sino que también se ignora qué tipos de espacios vacíos existen en esta información. Esta situación es derivada fundamentalmente de la circunstancia que la información existente corresponde a especies como las bovinas, caprinas, nuestra propia especie, y menos de media docena de especies de laboratorio, lo cual responde a un evidente y comprensible interés práctico.

Fuerza es reconocer que el estudio de las caseínas convoca la atención de especialistas de variados campos de la biología experimental. Entre ellos, los genetistas han contribuido en forma decisiva en la solución de los grandes problemas teóricos. Su tarea ha demostrado que la investigación en este campo necesita de una inevitable visión integradora. La profusión de alelos y de variantes, la sorprendente interacción génica, y los variados procesos epigenéticos involucrados da un nuevo sentido a toda una historia de conceptos, hipótesis y predicciones de la genética. Los conceptos y definiciones de multialelismo, epistasia, poligenia, corresponden a palabras que nacieron mágicas y elusivas, que fueron generadas a partir del asombro de lo percibido y con una certidumbre que tenía más de fe que de evidencia. Después de cien años ellas están arribando a su increíble mundo real, múltiple en su estructura, maravilloso en su funcionamiento e impredecible en su aplicación. Pero es necesario recalcar que ese mundo, del que estamos hechos los seres vivos, exige inculdicable responsabilidad en su manejo.

Esta revisión que presentamos trata de exponer una descripción relativamente abarcativa de la información más saliente vinculada a las caseínas desde un punto de vista biológico. No se trata de una revisión de los aspectos técnicos lactológicos, lo

cual corresponde a un campo muy desarrollado de la industria y la investigación, ni abarca aspectos médicos relacionados con el consumo de leche en la sociedad moderna.

Desde esta posición, el objetivo de esta publicación consiste en proporcionar información respecto a una serie de tópicos que representan aquellos temas que tienen una reconocida vinculación con los temas más generales de la biología: fisiología, y evolución. Dentro del primero, se hace referencia a los aspectos de la síntesis, su regulación y las estructuras moleculares comprometidas en estos mecanismos. La evolución está implícita cuando se mencionan las hipótesis más aceptadas sobre su origen y el de los grupos de Vertebrados en que se generó la lactancia.

Podemos plantear algunas preguntas que no han sido plenamente contestadas hasta ahora, y a las cuales solamente una mayor tarea de investigación podrá dar respuesta. ¿Es imprescindible la acción de una quimosina para digerir la leche? ¿Esta enzima, se encuentra en el estómago de todos los mamíferos recién nacidos? ¿La estructura de las micelas de caseínas es similar en todas las especies? ¿Se limitan las diferencias a las encontradas entre la especie humana y las de los artiodáctilos? ¿Dada la condición notoriamente hidrofóbica que domina en el interior de las micelas, por qué otras proteínas del lactosuero con reconocidas características que involucran porciones hidrofóbicas en su estructura nunca forman parte de las micelas? ¿Cuáles son las ventajas de expresar varios tipos de caseínas? ¿No es suficiente con una caseína calcio-sensible y otra que proteja la dispersión de las micelas en medio acuoso? ¿Por qué hay tanta variabilidad interespecífica en la expresión de los tipos de caseínas? ¿La gran cantidad de variantes genéticas en las especies estudiadas es una característica general de las caseínas?

Creemos que el sólo planteo de preguntas ayuda a una interpretación global de este mecanismo tan especial. Es en parte derivado de lo anterior que creemos que el estudio de los aspectos comparativos se encuentra en un momento de transición y que se necesitará más de una década para tener una visión conceptualmente completa de este parte de la fisiología de la lactación.

Gran parte de lo expuesto en esta obra se basa en resultados obtenidos por los autores a partir de ensayos, determinaciones y análisis de muestras biológicas. En lo que se refiere a las muestras de leche de numerosas especies, silvestres y domesticadas, queremos aprovechar para agradecer la generosidad de profesiona-

les pertenecientes a varias instituciones que desinteresadamente nos las han provistos, entre ellos la Dra. Marcela Uhart, Dra. Myrta Lewis, Dra. Ema Casanave, Dra. Liliana Chireno, Dr. Claudio Campagna, Dr. Alejandro Vila, Dr. Guillermo Schwint, Sr. José Yapur, Ing. Victor Herrera. Así también hacemos llegar nuestro agradecimiento a nuestros compañeros de trabajo Sr. Gerónimo Fernández, Lic. Felipe Castro, Lic. Gabriela Silenzi y Bqca. Gabriela Pérez por la colaboración brindada.

Nuestro especial agradecimiento a la Fundación Miguel Lillo por la publicación de la presente obra.

Agradecemos las atinadas sugerencias y aportes de los árbitros anónimos, como así también al Dr. Jaime Powell por su lectura crítica de la parte de Evolución de la Lactación. Al Sr. Gustavo Sánchez por el óptimo trabajo de edición gráfica. Asimismo nuestro reconocimiento a la Editora de *Acta zoológica lilloana*, Dra. Monique Halloy, por su eficiente labor en todo lo relacionado a la edición de este libro.

Hacemos constar que para la realización de los trabajos que culminaron en esta obra hemos contado con el apoyo de la Fundación Miguel Lillo y del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (Proyectos CIUNT).

Parte de la información que se presenta se encuentra en la tesis doctoral de Marcela Hernández de Sánchez. Otra parte corresponde a conceptos e información integrantes de la tesis de Magíster de Graciela Ruiz de Bigliardo (en formación al momento de entregar el borrador a la Editorial de la Fundación Miguel Lillo).

LOS AUTORES

— Primera parte —

## Generalidades sobre la Lactación y los Componentes Lácteos

---

Los mamíferos constituyen el grupo de Vertebrados más exitoso, entendiendo como tal atributo la capacidad de adaptación a variados nichos ecológicos. Es significativo que la Clase Mammalia descende de otro grupo, los Cinodontes, que también llevaron a cabo una notable radiación, quizás no tan exitosa como la de sus descendientes, pero constituyeron la fauna dominante desde fines del Pérmico hasta comienzos del Jurásico (Oftedal, 2002a). La base de estos logros, sobre todo lo correspondiente a este último millón de años, se encuentra muy relacionada con varias características del grupo. Algunas de estas características, como es el caso de la endotermia y su función asociada la termorregulación, la comparan con otros grupos de Vertebrados extintos y existentes. Lo mismo debe decirse sobre la capacidad excepcional de contrarrestar los ataques microbianos, basada en la respuesta inmunológica, cuyo desarrollo, complejidad y eficiencia es equivalente a las funciones homólogas que se encuentran en las aves. Pero sin duda que su característica distintiva, y que tuvo enormes consecuencias en la evolución, fue el desarrollo de un nuevo tipo de alimentación neonatal, la lactación.

Esta especialidad constituye la principal innovación de la reproducción de los mamíferos, y es la más importante por las consecuencias que tuvo sobre su exitosa radiación. La lactación es una función que se presenta solamente en esta Clase de Vertebrados y en todas sus especies.

Uno de los rasgos diferenciales de la lactación consiste en que la producción del alimento para el recién nacido se lleva a

cabo en un órgano especializado: la glándula mamaria. Hay que mencionar que la existencia de una estructura destinada exclusivamente a la alimentación extracorpórea de las crías es un caso único entre los animales. Con un objetivo adaptativo similar existen otros grupos de Vertebrados que fabrican alimento para las crías, tal como se conoce que se lleva a cabo en flamencos, el pingüino emperador y varias especies de palomas (Shetty *et al.*, 1992; Horseman y Buntin, 1995). Sin embargo en estos animales, que proporcionan a sus crías la "leche del buche", no se han desarrollado órganos especializados a tal propósito.

Otro aspecto destacable consiste en que la glándula mamaria sintetiza leche a partir de sustratos derivados de la dieta o de reservas fisiológicas del organismo. Más adelante nos referiremos a ello como mecanismo de interconversión especializado. Estos aspectos constituyen una función importante que tiene un fuerte componente adaptativo dado que mantiene una compleja interrelación con el metabolismo energético específico. Esta variable metabólica, que está referida al peso del animal, varía en forma no lineal con la masa de manera tal que es directamente proporcional a la masa elevada a un exponente que varía, según la especie, alrededor de 0,75. O dicho de otra manera, el consumo de energía por gramo de peso es mayor en un animal pequeño en relación al más pesado. Ello explica que los animales pequeños al tener un metabolismo energético elevado consumen proporcionalmente mayor cantidad de alimento que los animales de mayor peso que tienen un metabolismo relativamente más bajo. Al ser mayores las exigencias energéticas para los más pequeños, éstos no pueden acumular reservas como lo hacen los animales más grandes. Lo mencionado significa que en las situaciones fisiológicas de preñez y lactación los mamíferos más pequeños están obligados a un esfuerzo metabólico mucho más grande que los de mayor masa corporal. Si se tiene en cuenta que, tomados como masa, entre el 80 y el 90% (según la especie) de los componentes de la secreción láctea es fabricado en la glándula mamaria, se comprende el trabajo adicional que significa la función de amamantamiento (cría) en los mamíferos cuanto mas pequeño es el tamaño de la especie.

A lo relacionado con la *masa de los componentes fabricados* en la propia glándula hay que agregar la *especificidad* de estos compuestos. Estos constituyen, en una gran proporción, moléculas que solamente se encuentran en esta secreción, es decir que no

se encuentran en el resto del organismo. Esta característica se nota particularmente en las proteínas, las cuales constituyen una proporción sustancial de la materia seca de la leche. Por ejemplo, entre los glúcidos, la lactosa y los oligosacáridos (los cuales incluyen generalmente en sus moléculas a los grupos lactosilos) constituyen el 98% de los carbohidratos de la leche. Para el tema que nos ocupa hay que señalar que las caseínas son un grupo de proteínas privativo de la secreción láctea.

Desde la óptica referida al origen de los componentes que se encuentran en la leche podemos clasificar a éstos en tres tipos: a) los que se sintetizan exclusivamente en la glándula mamaria, b) los que sintetizándose en la glándula mamaria son idénticos a los elaborados por otros órganos de la economía, y c) aquellos que no se sintetizan en esta glándula, sino en tejidos extramamarios pero pasan a la secreción láctea.

Esto último se lleva a cabo mediante la captación, a partir de la circulación, de estos componentes, y su pasaje mediante mecanismos paracelulares o varias rutas transcelulares hacia la luz alveolar (Shennan y Peaker, 2000). Cabe acotar que los componentes orgánicos de la leche guardan una especial semejanza interespecífica. Si bien este aspecto será tratado en profundidad mas adelante, debemos mencionar que algunos de ellos, como es el caso de las proteínas, y para el objetivo de este trabajo, el de las caseínas, tienen una gran semejanza en varios aspectos estructurales, incluidos alguno no convencionales.

La leche contiene todos los nutrientes, plásticos y energéticos, requeridos para el crecimiento y desarrollo del neonato. Asimismo contiene factores destinados a la defensa contra microorganismos y parásitos, que protegen el tracto gastrointestinal de la cría. Debido a la reconocida mayor importancia nutritiva de las caseínas, en este trabajo trataremos sobre todo lo relacionado con este campo. Sin embargo, hay que señalar que numerosos trabajos de fisiología de la nutrición han revelado el papel que pueden jugar los péptido derivados de las caseínas en los mecanismos de defensa, la actividad neural, y algunas funciones endócrinas.

Los componentes orgánicos principales de la leche comprenden proteínas, glúcidos y lípidos. Asimismo se encuentra una gran cantidad de moléculas menores derivadas de estos componentes. Walstra y Jenness (1989) estiman que en la leche existen más de 100.000 compuestos distintos, lo cual incluye una gran proporción de metabolitos muy relacionados estructuralmente.

## LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE

Las proteínas que son sintetizadas exclusivamente por la glándula mamaria, y las caseínas en particular, constituyen la parte central de un sistema adecuado y casi privilegiado para los estudios sobre genética, genómica y proteómica. Ello se debe a la función que cumplen (casi exclusivamente nutricional en el caso de caseínas), a los mecanismos celulares que desastan su síntesis, claramente dependientes de vías de señalización activadas por un grupo conspicuo de hormonas y factores de crecimiento —y el efecto activador/permisivo de interacciones celulares—, y por hallarse todo el sistema en un órgano especializado, la glándula mamaria, la cual es prescindible para el animal desde el punto de vista de su supervivencia. Es por ello que, ya sea por los estudios en los cuales la lactación es un objetivo concreto, o su mecanismo es una herramienta para dilucidación de otros procesos o estructuras, la información sobre la fisiología molecular de las proteínas lácteas y el conocimiento asociado, o relacionado, es uno de los que más rápidamente está creciendo en la biología experimental.

Las proteínas lácteas, como es sabido, han sido clasificadas en dos grupos, las caseínas (Cns) y las proteínas del lactosuero (PLS), atendiendo a su precipitación o solubilidad, respectivamente, a un rango de pH entre 4,2 - 4,6.

Las caseínas corresponden a cuatro tipos:  $\alpha_{s1}$ Cn,  $\alpha_{s2}$ Cn,  $\beta$ -Cn y  $\kappa$ -Cn. Las tres primeras son las caseínas denominadas “calcio sensibles” por el hecho de precipitar en presencia de calcio iónico entre 2 y 6 mM (Farrell *et al.*, 2004). Además de esta característica estas caseínas son hidrofóbicas y como tales no podrían mantenerse en solución acuosa sin agregarse y precipitar.

Debemos agregar que las caseínas tienen masas moleculares bastantes parecidas (25 a 32 kDa, con menor frecuencia a 40 kDa) si se tiene en cuenta el amplio rango (14 a 250 kDa, las más importantes) que abarcan el resto de las proteínas lácteas.

La  $\kappa$ -Cn no es sensible a la precipitación por calcio. Además de esta característica fisicoquímica, la  $\kappa$ -Cn tiene una secuencia de aminoácidos, determinada por la secuencia de nucleótidos de la región codificante del gen, que la distingue del resto de las caseínas.

Las caseínas calcio sensibles están comprendidas dentro de un grupo más grande de proteínas del organismo en los Verte-

brados. Esta macrofamilia de proteínas tienen dos características generales: a) unirse al calcio y b) actuar en el espacio extracelular (Kawasaki y Weis, 2003; Kawasaki *et al.*, 2004).

Como se ha mencionado, las caseínas calcio sensibles tienen una función esencialmente nutricional en la cría. La  $\kappa$ -caseína en cambio, si bien va a tener un destino de beneficio alimentario, su función más importante consiste en mantener en suspensión al resto de las caseínas y constituir con ellas las *micelas de caseína*. Estas estructuras multimoleculares, que poseen un muy alto porcentaje de caseínas sensibles al calcio, tienen la particularidad de mantenerse en la leche en forma dispersada, sin precipitar. Ello es posible porque la estructura de las micelas tiene una disposición en la que la  $\kappa$ -Cn recubre, en el lado externo de esta estructura multimolecular, al resto de las caseínas, que de esta manera se encuentran sobre todo en el núcleo de la micela.

Las micelas también pueden contener otras moléculas, *las proteínas asociadas a las micelas*, que varían entre distintas especies animales (Hernández de Sánchez, 2008).

El otro grupo de proteínas, las proteínas del lactosuero, conforman un conjunto muy variado de péptidos y proteínas, las cuales poseen diversas funciones y características moleculares.

Como ya se ha mencionado, las caseínas son sintetizadas en la glándula mamaria y guardan una gran semejanza entre ellas, sobre todo si se las compara con la heterogeneidad que representan las proteínas del lactosuero. Es en éstas donde se observan las mayores variaciones, tanto estructurales como funcionales. Ello pone en evidencia, por otra parte, la diversidad de los mecanismos utilizados por la evolución para que el organismo de la madre pueda proveer a su utilización por parte de la cría.

Las distintas proteínas del lactosuero pueden ser sintetizadas en las siguientes localizaciones:

a) en el tejido epitelial secretor en la glándula mamaria, como ocurre en caso de la  $\alpha$ -lactalbúmina y de la  $\beta$ -lactoglobulina,

b) en células residentes en la glándula mamaria, como es el caso de los linfocitos B y células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas en la época de lactación,

c) fuera de la glándula mamaria, como ocurre con la seroalbúmina,

d) tanto en la glándula mamaria como en otros tejidos de la economía, como sucede con la lactoferrina en muchas especies, que es sintetizada en otras glándulas secretoras, como también

en los leucocitos fagocitarios. La síntesis en la glándula mamaria implica la captación de aminoácidos y péptidos a partir de la circulación (Groneberg *et al.*, 2002), lo cual es muy dependiente de los tipos de lactación y tamaño de la especie.

Cabe hacer mención a la variabilidad interespecífica de la expresión de las proteínas lácteas. Respecto a ello hay que distinguir por lo menos dos modalidades.

1) En primer lugar, aquellas proteínas de la leche que se han encontrado hasta ahora en todas las especies estudiadas, tal es el caso de las inmunoglobulinas, la seroalbúmina y las caseínas  $\kappa$  y  $\beta$ .

2) En segundo término, las proteínas que se han hallado solamente en ciertos grupos de mamíferos, como ejemplo la  $\beta$ -lactoglobulina, que se encuentra en la leche de bóvidos, équidos y otras especies que no guardan especial relación taxonómica con éstos. Dentro de este grupo se encuentra también la proteína ácida del suero lácteo (WAP) que ha sido identificada en algunos roedores, lagomorfos, perisodáctilos y camélidos.

La historia de la investigación sobre este tema parece indicar que es improbable que exista una proteína láctea cuya presencia estuviera restringida a una sola especie o un grupo filogenético restringido. En este sentido, la experiencia de las últimas décadas ha mostrado varios casos en los cuales se había supuesto en un primer momento algo parecido a la expuesto pero luego las observaciones, extendidas a otros grupos de mamíferos, mostraron la presencia de proteína(s) ortóloga(s) en varias especies o grupos de mamíferos diferentes y no especialmente relacionados desde un punto de vista evolutivo. Así ocurrió con la  $\beta$ -lactoglobulina y con la WAP.

Las funciones de las distintas PLS son variadas. En general pueden agruparse en funciones de defensa contra microorganismos y parásitos, funciones nutritivas plásticas, nutritivas energéticas, funciones endócrinas, protectoras de la homeostasis de la leche —como es el caso del mantenimiento de las uniones sulfhidrilos en otras proteínas—, funciones de transporte de vitaminas u otras moléculas activas, etc.

Un aspecto particularmente importante de las proteínas lácteas es el correspondiente a sus variaciones genéticas intraespecíficas. Estas variaciones, que dependen de la presencia de alelos de genes mendelianos mayores, han recibido particular atención por parte de los genetistas interesados en la producción lechera. De hecho, el descubrimiento, hace varias décadas, de variantes gené-

ticas electroforéticas y su posible relación con caracteres de producción ha sido el motor más importante que hizo avanzar la genética molecular de las especies lecheras y la caracterización de sus razas en los años sesenta y setenta del reciente siglo. Para el caso, el estudio de la genética de las variaciones de los diferentes tipos de caseínas han creado condiciones que han permitido conocer en profundidad no solamente la estructura sino también los mecanismos genéticos moleculares que gobiernan la expresión de los diferentes genes y el papel que juegan las hormonas, la matriz extracelular y las interacciones intercelulares.

Probablemente la gran cantidad de estudios existente sobre las variantes genéticas de las caseínas sea uno de los cuerpos de información más amplio que se han generado sobre la genética molecular de un grupo funcional y estructuralmente específico de proteínas.

El aspecto de la variación interespecífica en la expresión de las proteínas lácteas posee características y alcances al que no escapan las caseínas: dos de ellas ( $\beta$ -Cn,  $\kappa$ -Cn) parecen estar en todas las especies; tres de ellas ( $\alpha_{s1}$ -Cn,  $\beta$ -Cn,  $\kappa$ -Cn) se encuentran en las muestras de especies en las cuales se las ha buscado y han sido identificadas, y hay razones para suponer que la  $\alpha_{s1}$ -Cn y la  $\kappa$ -Cn siempre serán encontradas puesto que hay información que induce a pensar que, si no se expresaran en las células epiteliales del alvéolo mamario, la secreción de todas las caseínas estaría dificultada o impedida (Chanat *et al.*, 1999; Shekar *et al.*, 2006).

Además de las formas monoméricas, las caseínas en la leche pueden encontrarse también en forma de oligómeros o polímeros. Ello es debido a la formación de uniones covalentes a través de puentes disulfuros entre los monómeros. Además de los hallazgos en la leche de cabras, ovejas y vacas, que ya se conocían, esta característica se ha comprobado en la leche de otras trece especies de mamíferos (Hernández de Sánchez, 2008).

Estos oligómeros involucran a la  $\alpha_{s1}$ -Cn, la  $\alpha_{s2}$ -Cn, y la  $\kappa$ -Cn, las cuales pueden formar homo-oligómeros o hetero-oligómeros. Los primeros involucran a un solo tipo de caseína, ya sea  $\alpha_{s1}$ -Cn,  $\alpha_{s2}$ -Cn o  $\kappa$ -Cn. Los hetero-oligómeros son de dos categorías: los que están integrados por dos o tres tipos de caseínas y los que incluyen también a otras proteínas distintas de las caseínas. Debido a que la  $\beta$ -Cn no tiene grupos sulfhidrilos libres, no interviene en la formación de estos oligómeros.

También debe hacerse mención a la existencia de *proteínas asociadas a las micelas* de caseínas. Estas proteínas, si bien no son caseínas, tienen la particularidad de integrar las micelas y se las ha encontrado en casi todas las muestras de leche en las cuales se han separado las micelas por distintos métodos. Curiosamente, pero no inesperadamente las proteínas asociadas varían según las especies de mamífero estudiadas, pero presentan regularidad dentro de la misma especie (Hernández de Sánchez, 2008), aspectos que serán descritos más adelante.

Por último, debe hacerse referencia a una característica de las caseínas que involucra a las proteínas del lactosuero, aspecto que parece ser menor, pero es importante desde el punto de vista nutricional y de la fisiología del desarrollo, y sobre el cual, afortunadamente, hay suficiente información: la cantidad absoluta y relativa de las proteínas en la secreción láctea de diferentes especies. Ello está vinculado a la relación existente entre estas variables y las características biológicas del desarrollo neonatal tales como el aumento medio de peso y la maduración del sistema nervioso.

## LOS COMPONENTES LIPÍDICOS DE LA LECHE

El organismo de la madre reprocesa los lípidos, fundamentalmente triglicéridos, contenidos en la alimentación o los que se encuentran en sus reservas y los convierte en grasas con características especiales que van a formar parte principal de los glóbulos grasos que se exportarán por la leche para la alimentación de la cría. En este sentido hay dos formas en que la glándula mamaria puede llevarlo a cabo: mediante la utilización de los mismos ácidos grasos de la dieta o mediante la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Para este proceso la glándula mamaria cuenta con un mecanismo que es idéntico, en la parte enzimática, al mecanismo que poseen todos los órganos de la economía, tanto de los mamíferos como de los Vertebrados en general. La diferencia estriba en la vía de señalización que lo pone en marcha. En este aspecto los mamíferos cuentan con un sistema, que es activado por los carbohidratos y las hormonas tiroideas, los cuales inducen, en las células epiteliales secretoras, la síntesis del factor denominado Spot 14, que es una proteína pequeña con

capacidad de unirse a los sectores promotores de los genes correspondientes a las enzimas lipogénicas en la glándula mamaria (Zhu *et al.*, 2005). Esta vía de señalización es propia de los mamíferos y de la glándula mamaria. Es pertinente mencionar que la síntesis *de novo* de ácidos grasos en la glándula es inhibida por el ácido linoleico conjugado (CLA) (*trans*-10 *cis*-12) y otros dos isómeros. El (los) CLA proviene de la dieta y, en el caso de los bovinos, de la actividad de los simbioses del rúmen. Como se ha mencionado, el efecto regulador mencionado se lleva a cabo a través de la vía de señalización del Spot 14 (Bauman *et al.*, 2008).

La mayor parte de los lípidos de la leche (98%) son triacilgliceroles, mientras que los fosfolípidos alcanzan un 1%, y los esteroides, incluidos los ésteres del colesterol, un 0,35%. El resto corresponde a gangliósidos, esfingomielina, plasmalógenos y cerebrósidos (Jensen, 2002). En su mayor parte, estos lípidos de la leche tendrán una utilización claramente energética, y una parte mínima pero cualitativamente importante asumirán funciones plásticas (Nakamura *et al.*, 2003) ya que entrarán a formar parte de las membranas celulares, tal es el caso de los fosfolípidos y los esteroides. Los fosfolípidos proporcionan a la cría la mayor parte de los ácidos grasos de cadena larga poli-insaturados (Jensen *et al.*, 1990). Respecto a algunas cualidades salientes de los ácidos grasos que forman parte de los triacilglicéridos, se sabe que los ácidos grasos de cadena mediana (C 10:0 y C 12:0) tienen efectos bactericidas, como así también, antivirósicos y antimicóticos. La capacidad antimicótica también ha sido reconocida en los ácidos grasos de cadena muy corta. Por otra parte existen derivados de esfingomielina que, después de la digestión en el tracto gastrointestinal del lactante, tendrían funciones bacteriolíticas (Sprong *et al.*, 2001). Los gangliósidos que están presentes en pequeñas concentraciones han sido mencionados como inhibidores de algunas toxinas bacterianas (Laegrid *et al.*, 1986).

Un papel muy importante de un par de ácidos grasos saturados (palmítico y mirístico) consiste en la formación de *proteínas aciladas* que se encuentran ancladas en los raft de las membranas a través de estas cadenas hidrofóbicas a las que están covalentemente unidas (de Souza *et al.*, 2002). De esta forma, los grupos miristoilo y palmitoilo contribuyen específicamente a la estructura de la membrana. Si bien algunas de estas cadenas pueden ser generadas en el organismo de la cría lactante, dada la gran can-

tividad proporcionada por la alimentación materna, la mayoría proviene de ésta. No cabe decir lo mismo de las proteínas que están unidas a grupos farnesilos y geranilos, los cuales provienen de isoprenoides que son sintetizados por el neonato.

Sobre los lípidos y su papel en la leche existen varias revisiones interesantes (Jensen *et al.* 1990; Jensen, 2002), incluido lo relacionado con los glóbulos grasos de la leche (Mather, 2000; Keenan, 2001; Cavaletto *et al.*, 2004) tema que es central en la fisiología de los lípidos de la leche.

Desde el punto de vista de la presente revisión, uno de los aspectos que relaciona los lípidos con las caseínas tiene que ver con la naturaleza hidrofóbica de los primeros y la característica anfipática de las micelas de caseínas. Estas estructuras tienen una cubierta exterior dominada por la presencia de la  $\kappa$ -caseína, mientras que el resto de las caseínas, que son claramente hidrofóbicas, se encuentran en el interior de las micelas. Las micelas tienen una estructura ligeramente “esponjosa”, con espacios y nanocanalículos que permiten la entrada de otros péptidos y proteínas. Ello permite que algunas de éstas, que tengan una parte de su molécula con dominio(s) hidrofóbico(s), se asocien con la micela a través de estos espacios. El resultado conduce a la particular situación en la que la distribución de algunas proteínas anfipáticas se reparten entre los dos compartimientos mencionados: el correspondiente a los glóbulos grasos y el de las micelas de caseínas. En este sentido, ello está relacionado a lo que nuestro grupo ha observado respecto a la distribución de la  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidasa en la leche de numerosas especies de mamíferos, en los cuales la mayor parte de la actividad de esta enzima se encuentra en los compartimientos caseínico y lipídico (Saad *et al.*, 2002). Incidentalmente debemos hacer mención al hecho que la ausencia o inhibición de esta enzima en la glándula mamaria provocaría la supresión de la síntesis proteica (Johnston *et al.*, 2004).

A partir de la mayor información actualmente disponible acerca del papel regulador de los ácidos grasos sobre la transcripción génica (Duplus *et al.*, 2000), seguramente la aplicación tecnológica proveerá que los aspectos nutricionales en el neonato se vean favorablemente beneficiados. Lo relacionado con los glóbulos grasos de la leche será mencionado mas adelante.

## LOS GLÚCIDOS DE LA LECHE

A partir de las teorías existentes sobre el origen de la lactación en los antecesores de los mamíferos actuales, hay razones para pensar que los glúcidos se encontraron entre los primeros y principales componentes de la secreción láctea en los Cinodontes de finales del Pérmico y principios del Jurásico (Oftedal, 2002a; 2002b). Estos carbohidratos, en forma de oligosacáridos o glicoconjugados habrían cumplido funciones de defensa inespecífica, tal como actualmente se les ha comprobado a los oligosacáridos lácteos (Chaturvedi *et al.*, 2001; Newburg *et al.*, 2004). Estos últimos pueden bloquear la unión de factores de adherencia bacterianos a receptores de membrana de las células intestinales, protegiendo al tracto gastrointestinal de la cría de la invasión microbiana.

En la gran mayoría de las especies estudiadas la lactosa es el glúcido lácteo que se presenta en mayor concentración. Por otra parte, los oligosacáridos se encuentran en variable concentración, lo cual depende de los grupos de mamíferos que se trate. Asimismo los glúcidos integran numerosos glicolípidos y glicoproteínas (Martin *et al.*, 2001) de la leche que tendrían funciones similares a las de los oligosacáridos (Nakamura *et al.*, 2003).

Es pertinente señalar que la cantidad relativa en que se presentan los dos tipos principales de carbohidratos, disacáridos y oligosacáridos, es marcadamente dependiente de la Familia zoológica a la que pertenecen los animales estudiados. Cabe mencionar que en la leche materna de nuestra especie, éstos últimos tienen una concentración más alta que en la mayor parte de los mamíferos en los que se los ha determinado.

Hay que indicar que el disacárido lactosa forma parte de la mayoría de los oligosacáridos de la leche en forma de restos lactosilos. Independientemente de esta característica estructural que puede ser calificada de oportunista, son llamativos dos hechos que coexisten con lo mencionado: el número grande de oligosacáridos distintos en una misma especie y la variabilidad entre especies en lo que respecta a estas estructuras de carbohidratos presentes en la leche.

El hecho que algunos oligosacáridos lácteos sean idénticos a los marcadores moleculares que constituyen los grupos sanguíneos y que sigan las variaciones genéticas entre diferentes individuos (Chaturvedi *et al.*, 2001) refuerza la hipótesis, por otra parte

ampliamente aceptada, de su capacidad bloqueante de la adherencia de los microorganismos patógenos. Hay que agregar que se ha comprobado, adicionalmente, su actividad como inmunomoduladores (Klein *et al.*, 2000). Es interesante el hecho que la capacidad bloqueante de la adherencia no se ejerce de la misma manera frente a los microorganismos benéficos como es el caso de varias especies de lactobacilos.

Como se ha dicho previamente, la lactosa es el carbohidrato predominante en la leche de la mayoría de las especies mamíferas. Su concentración varía considerablemente; mientras que en algunos mamíferos marinos es muy baja o incluso indetectable, en la leche humana y de algunos perisodáctilos alcanza unos 200 mM (7 g/dl) (Faulkner *et al.*, 1987).

En la mayoría de las especies, la concentración de lactosa contribuye a mantener la osmolaridad de la leche. Este es un mecanismo en el que están asimismo involucrados el transporte de potasio y sodio y la permeabilidad al agua de las células secretorias epiteliales y de las células de los canalículos galactóforos de la glándula mamaria. Es llamativo que no haya mayor información sobre el papel de las acuaporinas en esta función de regulación en la glándula mamaria. Debido a que la glucosa es la única precursora de la lactosa en un doble sentido, directamente y través de transformación previa en galactosa, aquel monosacárido juega un papel central en la función de la glándula mamaria.

La síntesis de lactosa se lleva a cabo en varios pasos, el último de los cuales implica la formación de un enlace covalente entre la galactosa (a partir de UDP-galactosa) y la glucosa, con la formación del disacárido lactosa y la liberación de UDP. Este paso es catalizado por la galactosil-transferasa, para lo cual esta enzima cuenta con la colaboración de la  $\alpha$ -lactalbúmina, una proteína presente en el lactosuero lácteo. En la reacción mencionada, la presencia de la  $\alpha$ -lactalbúmina hace disminuir el  $K_m$  de la unión de la glucosa a la galactosil-transferasa por un factor cercano a 1000. De otra manera, en ausencia de  $\alpha$ -La, la síntesis de la lactosa por la galactosil-transferasa es prácticamente imposible. La galactosil-transferasa se encuentra en muchos tejidos involucrados en la síntesis de glicoproteínas, glicolípidos, polisacáridos y mucinas y está asociada con fracciones de las membranas más internas de las vesículas del aparato de Golgi. Solamente en la glándula mamaria, la galactosa es aceptora de la glucosa

libre. En otros sitios, los aceptores de la galactosa son los residuos de N-acetil-glucosamina. Este cambio en la especificidad de la galactosil-transferasa se produce por la interacción de la enzima con la  $\alpha$ -lactalbúmina, la cual, como se ha dicho, incrementa la afinidad de la galactosil-transferasa por la glucosa.

Debido a que la glándula mamaria no sintetiza glucosa, ésta debe ser obtenida de la circulación sanguínea. Durante la lactación el tejido mamario capta glucosa por medio de un sistema de transporte que recibe el nombre de las proteínas de membrana encargadas de la función: GLUT-1. A partir de estudios de inmunofluorescencia se ha visto que este sistema transportador se encuentra en la membrana basal de las células secretorias del epitelio mamario (Shennan y Peaker, 2000). Se han descrito dos glicofomas de la proteína transportadora GLUT-1, una de ellas tiene una masa de 45 kDa y la otra de 55 kDa. Esta última contiene mayor cantidad de glúcidos (Brown, 2000). Durante la época de lactación, en los animales lecheros de gran producción, más del 85 % de la glucosa total de la sangre que irriga la glándula mamaria es incorporada por las células secretorias. Esta característica ejemplifica uno de los casos en los cuales existe una mayor diferencia arteriovenosa de la concentración de glucosa. La cantidad de glucosa captada por la glándula mamaria es considerada como el paso limitante de la velocidad de producción de la leche (Shennan y Peaker, 2000; Zhao *et al.*, 2004). Es obvio que este efecto no incluiría a las especies que tienen una baja o nula concentración de lactosa en la leche, como es el caso de los mamíferos marinos.

Existen también otros sistemas transportadores de pequeñas moléculas en la membrana basolateral del epitelio mamario. El transporte de aminoácidos desde la sangre al interior del epitelio secretor se lleva a cabo por medio de diferentes transportadores específicos de acuerdo a la clase de aminoácido.

El pasaje de inmunoglobulinas desde la sangre se realiza por transcitosis. Este transporte implica varios mecanismos a los cuales haremos referencia más adelante. Hay que señalar que gran parte de las inmunoglobulinas provienen de células plasmáticas ubicadas en los espacios intersticiales de la glándula mamaria (Neville, 1995).

## DISTRIBUCIÓN EN COMPARTIMIENTOS

Los componentes mencionados y otros a los cuales haremos referencia mas adelante, se distribuyen en compartimientos en la leche: los lípidos están contenidos en glóbulos grasos, la mayoría de las proteínas con cierto grado de hidrofobicidad, entre las cuales son dominantes las caseínas, forman las dispersiones coloidales denominadas micelas, y casi todos los minerales, la totalidad de la lactosa y el resto de las proteínas se encuentran en solución verdadera (Jensen *et al.*, 1995).

Desde esta perspectiva la síntesis y la secreción de leche involucran la formación de moléculas y estructuras inexistentes en el resto de los Vertebrados, entre las cuales hay que distinguir tres principales. En primer lugar, la estructura representada por los glóbulos grasos, luego, las micelas de caseína y, en tercer término, el sistema de la lactosa sintetasa, al que ya hicimos referencia.

Un aspecto interesante es el referido a la formación del glóbulo graso, lo cual ha sido estudiado con bastante detalle a nivel celular. El inicio de la formación del glóbulo graso se lleva a cabo en la célula epitelial secretora a partir de microgotas lipídicas que empiezan a formarse adheridas al retículo endoplasmático rugoso (RER). Estas gotas, rodeadas por material denso formado por proteínas, empiezan a coalescer entre sí aumentando su tamaño. En general, el proceso es tal que el aumento de tamaño de las gotas se debe a la fusión de estas microgotas con gotas progresivamente más grandes, pero el mecanismo de incremento del tamaño incluye tanto la fusión de pequeñas gotas como también el aporte de microgotas a las gotas lipídicas de gran volumen.

La cubierta de los glóbulos grasos en crecimiento, que se asemeja a una membrana, contiene además de las proteínas, una significativa cantidad de fosfolípidos, colesterol y cerebrósidos. La proporción de estos compuestos lipídicos aumenta, respecto a las proteínas, a medida que crece el glóbulo graso. La secreción del glóbulo graso hacia la luz alveolar se efectúa por un mecanismo de re-ensamblaje estructural de membranas en el que intervienen por lo menos tres proteínas, la butirofilina, la xantina-oxidasa y la adipofilina.

La butirofilina se encuentra en grandes concentraciones en la membrana apical de la célula secretora, mientras que la xantina-

oxidasa se encuentra en el lado citoplasmático. La adipofilina, por su parte, se encuentra en la periferia de las gotas de lípidos intracelulares (Mather, 1987; 2000). La butirofilina está insertada en la membrana celular y a través de su prolongación citoplasmática, se une a proteínas del citoplasma que están en contacto con el glóbulo graso intracelular, entre las que se encuentra la xantina-oxidasa. La butirofilina y la xantina-oxidasa se unen a los gránulos secretorios por interacción con la adipofilina que está en la periferia de los mismos, facilitando la envoltura del glóbulo con la membrana plasmática (Nielsen *et al.*, 1999; Robenek *et al.*, 2006).

El glóbulo graso que ha tomado contacto con la membrana apical se protruye progresivamente hacia la luz del alvéolo. Dada la afinidad demostrada entre la membrana celular, mediada por las proteínas mencionadas, y la cubierta del glóbulo graso en el proceso de englobamiento, éste se lleva a cabo por un mecanismo de “cierre relámpago” en el cual la membrana celular termina de rodear al glóbulo graso que sale a la luz alveolar por un proceso similar a la exocitosis, desprendiéndose de la célula. En este proceso puede quedar incluido parte del material citoplasmático que se evidencia como “*creciente*”, en referencia a la fase lunar (Keenan y Patton, 1995; Keenan, 2001).

Las micelas de caseínas constituyen complejos proteicos especializados que contienen la totalidad de las caseínas y de otras proteínas, los cuales no tienen entre los animales ninguna estructura que pudiéramos considerar ni homóloga ni análoga. Sobre la estructura de las micelas vamos a hacer un análisis más adelante.

## DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS EN LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE

Las diferencias interespecíficas involucran: a) a las proporciones relativas de los componentes principales (proteínas, lípidos y glúcidos); b) a las estructuras moleculares de cada uno de estos componentes, sobre todo proteínas (y en menor grado oligosacáridos) todos los cuales generalmente poseen una variación interespecífica mayor cuanto más distantes es la relación filogenética; y c) al grado en que contribuyen algunos componentes específicos relacionados con los principales, tales como los fosfolípidos, proteínas menores del lactosuero y oligosacáridos. Hay que men-

cionar que el conocimiento detallado de los constituyentes de la leche está restringido a unas pocas especies de mamíferos. El grueso de la información existente sobre otras especies, especialmente no domésticas, que sirve de base a los estudios comparativos está a menudo limitado a los datos de los constituyentes mayores.

En todas las especies estudiadas hasta el momento la composición de la leche también varía de acuerdo al estado de la lactación. Ello significa que los tiempos absolutos y relativos respecto a la edad de la cría, y la dirección y el grado de los cambios que en las concentraciones pueden acaecer, suelen diferir —y a veces en grado notable— entre las especies de los distintos grupos taxonómicos. Para dar un ejemplo extremo pero real se puede citar el caso de algunos mamíferos marinos donde los tiempos de lactación son cortos y las concentraciones de la leche no cambian significativamente en su desarrollo. En cambio, en la mayor parte de los bóvidos, la concentración y naturaleza de los componentes de los primeros días (calostro) son claramente distintas respecto a la leche madura que a su vez va cambiando paulatinamente.

Los procedimientos de muestreo empleados para la extracción de la leche también pueden influir en el grado de variabilidad que se observa al analizarla. En la mayoría de los casos, los estudios comparativos que se han realizado y que se presentan en la bibliografía se han efectuado con pocas muestras, lo cual constituiría una causa de variación ya que la información observada podría estar sesgada respecto a la población. No ocurre lo mismo con los estudios genéticos y productivos que se llevan a cabo en las especies lecheras: vacas, cabras, y ovejas. En este grupo hay que incluir numerosos estudios llevados a cabo en camélidos del viejo mundo.

La razón de la discrepancia es claramente explicable: los estudios con animales silvestres, de especies cada vez menos numerosas, muchas de ellas en vías de extinción, exige especiales cuidados y dada las dificultades, también el costo se incrementa. Todo ello tiene como consecuencia dos hechos, que las muestras son escasas y que los estudios están necesariamente volcados a aspectos cualitativos en desmedros de los enfoques poblacionales, los cuales son poco menos que impensables.

La leche de distintos grupos zoológicos presenta diferencias en cuanto a la concentración de los componentes. Como una

aproximación al tema debemos mencionar que la secreción láctea con menor contenido de materia seca es la de los primates. Siguen la de los équidos entre los perisodáctilos, y tienen valores mas cercanos a las medias los contenidos de materia seca de bovinos y caprinos entre los artiodáctilos. En otro extremo, la leche con mayor contenido de materia seca corresponde a la secretada por los lagomorfos, varios roedores y algunos carnívoros (muy especialmente pinnípedos).

Dentro de algunos niveles taxonómicos definidos existe un notorio grado de constancia en la composición. Las diferencias existentes entre representantes de distintos Órdenes, en las proporciones de los componentes principales, tienden a ser mayores que las diferencias interespecíficas dentro de cada Orden. Parte de la información existente en la bibliografía sobre valores de concentración de componentes difieren mucho, ya sea intraespecíficamente o entre especies, es decir, que tienen una amplia dispersión y que configuran resultados que pueden considerarse aparentemente atípicos. Ello pone en evidencia que se necesita mayor información para conocer si los valores aparentemente atípicos representan la media de la población (lo cual significarían tendencias adaptativas), o si en realidad obedecen a problemas de muestreo.

Es obligado mencionar una publicación escrita por Ben Shaul (1962) sobre los componentes principales de la leche de 90 especies de mamíferos, la cual data de hace casi medio siglo y es una de las pocas que contenían información sobre un grupo tan extenso de animales. Su importancia no es anecdótica, puesto que fue prácticamente la primera de su tipo y que sirvió para las conjeturas iniciales sobre los aspectos comparativos de la secreción láctea.

## AISLAMIENTO Y TECNOLOGÍA

Las proteínas del lactosuero y las caseínas difieren en cuanto a características fisicoquímicas, lo que permite separarlas por medio de distintas técnicas, entre las que se pueden mencionar sucintamente:

a) Precipitación isoelectrica: las caseínas son insolubles en la zona de su punto isoelectrico correspondiente a un pH (para la leche de vaca) cercano a 4,6 y a una temperatura superior a 8

°C. El pH puede variar ligeramente entre distintas especies. Kunz y Lönnerdal (1990) comprobaron una mejor precipitación de las caseínas humanas a pH 4,3.

b) Coagulación: las micelas de caseínas son mantenidas en suspensión debido a la propiedad anfipática de la  $\kappa$ -Cn. Es por ello que la ruptura de esta molécula por la quimosina gástrica en dos segmentos, uno claramente hidrofóbico y otro hidrofílico, el glucomacropéptido, produce la separación de este último que se disuelve en el lactosuero. La precipitación del resto de las caseínas es una consecuencia de la desaparición de la capacidad protectora/solubilizante de la  $\kappa$ -caseína. La quimosina, enzima que actúa sobre la  $\kappa$ -caseína produciendo este efecto, es segregada en el estómago de la cría mientras dura la alimentación láctea. En la utilización práctica tecnológica, la quimosina, conocida también como rennina, de la cual se dispone en el mercado, tiene variado grado de pureza, presentación y diferente denominación, como por ejemplo, el *cuajo* (que proviene del estómago de los rumiantes) y *rennets* que son purificadas a partir del mismo origen. Si bien en la pared del estómago del lactante de la mayor parte de las especies estudiadas se sintetiza y libera esta enzima hidrolítica hacia la luz gástrica, no es seguro que el mecanismo actúe de la misma forma en todas las especies de mamíferos. Existe la posibilidad de que algunas de éstas no sintetizen esta enzima y que la función hidrolítica la llevan a cabo las proteasas típicas del estómago. Relacionado con ello, en nuestro laboratorio hemos observado que algunas muestras comerciales de quimosina purificada a partir de estómago de ternero no actúan sobre la leche de algunas especies silvestres (Hernández y Fernández, inédito), a pesar que sí lo hace perfectamente sobre las preparaciones de leche de artiodáctilos (cabra, vaca, oveja, llama, vicuña). La amplia experiencia del sector de lactotecnología ha demostrado que las caseínas pueden coagular por medio de proteólisis dirigida en la cual se emplean preparaciones de otras proteasas. Además de las conocidas enzimas de origen gástrico también se emplean proteasas extraídas de vegetales. Los efectos de las enzimas proteolíticas sobre las caseínas serán tratados más adelante.

c) Ultrafiltración: por este procedimiento, se pueden separar las micelas de caseínas de las proteínas del lactosuero en base a la diferencia de tamaño. Dado el gran desarrollo de la tecnología en este campo, se cuenta con una enorme gama de tipos y

formas de membranas que pueden separar casi todo el espectro existente de masas moleculares en casi todas las cantidades requeridas. Los diferentes tipos de filtración por membranas son poco utilizados en los laboratorios experimentales, salvo aquellos dedicados a investigación en tecnología de alimentos.

d) Ultracentrifugación: los métodos de centrifugación a alta velocidad son muy eficientes en la medida en que se tenga en cuenta la velocidad y las características de la leche de la especie en estudio. Las especies con micelas de caseínas más pequeñas necesitan mayores velocidades para que las micelas puedan precipitar. Las caseínas de varias especies, incluida la humana, pueden ser precipitadas utilizando centrífugas de mediana a alta velocidad, aspecto que será tratado más adelante.

e) A los anteriores métodos preparativos hay que agregar la gran cantidad de técnicas analíticas que se han generado y siguen perfeccionándose en la instrumentología bioquímica. Entre ellos se destacan los diversos tipos de filtración por columnas, de intercambio iónico, de afinidad específica, y la gran cantidad de versiones de HPLC que se han vuelto imprescindibles en la investigación biológica experimental actual.



— Segunda parte —

# Origen, estructura y función de las proteínas lácteas

---

## LAS PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO

El término proteínas del lactosuero ha sido usado para describir el grupo de proteínas que permanecen solubles en la leche después de la coagulación de las caseínas por la quimosina, o después de la precipitación de las caseínas a pH ácido. Las proteínas del lactosuero (PLS) se encuentran en la leche en concentraciones que difieren entre distintas especies. No obstante hay que mencionar que la proteína que se encuentran en mayor concentración siempre es una de las cinco generalmente más abundante: seroalbúmina,  $\alpha$ -lactalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, proteína ácida del suero (WAP), o la lactoferrina. Esta última es dominante en la leche de nuestra especie en los primeros días de la lactación (Ronayne *et al.*, 2000). En la generalidad de los animales todo lo anterior es válido para la leche madura o de transición, porque en el caso del calostro siempre son dominantes las inmunoglobulinas.

En lo que sigue no efectuaremos particular referencia a la estructura molecular secundaria/terciaria de aquellas proteínas lácteas que se sintetizan también en otros órganos de la economía puesto que ello constituye información muy conocida en casi todas las disciplinas vinculadas a esos temas.

*Seroalbúmina.*— Esta proteína es sintetizada en el hígado donde pasa desde el retículo endoplásmico rugoso hacia el Golgi en forma de proalbúmina. En este compartimiento celular es hidrolí-

zado un péptido N-terminal antes de ser excretada hacia la sangre donde mantiene una concentración cercana al 40% del total de proteínas. La albúmina o seroalbúmina, tiene una masa molecular de aproximadamente 65 kDa. La albúmina de la leche es la misma proteína que se encuentra en el suero sanguíneo. La seroalbúmina es una proteína monomérica, globular y no está glicosilada ni fosforilada. Como excepciones se ha encontrado que, en la leche de algunas especies, o en algunas patologías humanas, pueden aparecer formas glicosiladas de esta proteína. Las funciones de la albúmina están relacionadas con el mantenimiento del equilibrio hídrico por la capacidad de adsorber agua y por la consiguiente presión oncótica que desarrolla. Asimismo tiene capacidad de unir y transportar a los principales cationes, como así también ácidos grasos, esteroides, bilirrubina, y hormonas tiroideas.

Su semejanza en la secuencia de aminoácidos con la  $\alpha$ -feto-proteína hizo que se las considerara pertenecientes a una misma familia. La similitud entre la seroalbúmina humana y del chimpancé es de un 99% en la secuencia nucleotídica y ligeramente menor en la de aminoácidos, mientras que con distintas especies de roedores, esta similitud se encuentra entre un 73 y un 77%. En nuestra especie se han encontrado por lo menos media docena de variantes genéticas.

Las concentraciones en que se encuentra en la leche son relativamente constantes en condiciones normales, pero aumenta significativamente en casos de mastitis. Se considera a esta proteína como una de las principales formas, junto con las caseínas, en que se transfiere una fuente significativa de aminoácidos al lactante. Al particular, existen observaciones acerca de su función como proveedora de aminoácidos para la síntesis de proteínas lácteas que demuestran que existen entre los mamíferos distintas estrategias para la utilización de aminoácidos. Asimismo se ha comprobado que la dieta influye en forma importante sobre las maneras en las que la madre sintetiza las distintas proteínas lácteas (Ronayne y Sambucetti, 1993).

*$\alpha$ -Lactalbúmina.*— Si a la seroalbúmina podemos atribuirle varias funciones posibles en la leche, ninguna de las cuales parece ser imprescindible en el estado actual del conocimiento, excepto la reconocida función nutricional plástica, en el caso de la  $\alpha$ -lactalbúmina podemos asegurar que la función que cumple en el interior de la célula secretora es, en la inmensa mayoría de los

mamíferos, imprescindible para que se lleva a cabo la lactación. La  $\alpha$ -La forma parte, junto con la galactosiltransferasa, del sistema enzimático que sintetiza la lactosa. Se la denomina también *proteína reguladora de la lactosa sintetasa*, y *proteína B* de la lactosa sintetasa. Esta proteína, de una masa molecular de unos 14 kDa, puede ser considerada como una metalo-proteína dado que normalmente une dos moléculas de calcio. Esta unión la lleva a cabo en dos sitios, y en uno de ellos con una muy alta afinidad.

Una variante de la  $\alpha$ -Lactalbúmina que incluye ácido oleico y a partir de ello posee una conformación distinta a la normal, tiene la capacidad de inducir apoptosis en células tumorales (Hakansson *et al.*, 1995; Düringer *et al.*, 2003; Svensson *et al.*, 2003; Fast *et al.*, 2005). Es significativo que otra forma de la proteína, una  $\alpha$ -lactalbúmina multimérica también tiene esta capacidad antitumoral (Williams *et al.*, 2004).

La  $\alpha$ -La es una proteína que solamente se expresa en la glándula mamaria. Ya se ha hecho referencia al hecho que en los mamíferos marinos que producen muy poca lactosa o que no la producen, la  $\alpha$ -La se encuentra en muy pequeñas concentraciones o es indetectable.

La expresión de la  $\alpha$ -lactalbúmina está bajo el control hormonal por parte de hormonas lactogénicas, prolactina, cortisol e insulina y de factores de crecimiento que llevan a cabo sus efectos en forma autocrina o paracrina. Junto con la  $\beta$ -caseína, esta proteína es sin duda la más estudiada en los trabajos sobre los efectos endócrinos en las células secretoras de la glándula mamaria, sobre todo utilizando técnicas *in vitro*. La  $\alpha$ -La puede presentarse glicosilada en la leche de algunas especies. La estructura de la  $\alpha$ -La es muy parecida a la de la lisozima y se ha demostrado que se originó a partir de esta enzima (Shewale *et al.*, 1984; Qasba y Kumar, 1997).

*$\beta$ -Lactoglobulina.*— Como se ha mencionado anteriormente esta proteína se encuentra en la leche de gran parte de los mamíferos, pero no tiene una distribución que parezca seguir una ordenación filogenética. Por ejemplo, se encuentra en varios primates pero no en nuestra especie, también forma parte de las proteínas lácteas de numerosos ungulados pero no en los camélidos. En este sentido, no ha podido ser detectada en la leche de los camélidos sudamericanos. Aunque su estructura guarda gran similitud con la proteína portadora de retinol y con las lipocali-

cinas, lo cual constituiría un fuerte indicio en el sentido que su función sería el transporte de ácidos grasos, grupos acilos o cadenas hidrofóbicas, ninguna función concreta se le ha podido asignar. Igualmente que lo que ocurre con la  $\alpha$ -lactalbúmina, esta proteína se expresa solamente en la glándula mamaria. Es sabido que la  $\beta$ -lactoglobulina no se encuentra en la leche materna de nuestra especie. En nuestro genoma no hay un gen activo que lo codifique, pero sí hay pruebas en el sentido que el gen se encontraba en nuestros antecesores homínidos. La prueba en este sentido lo constituye la presencia de la proteína en otros primates y el hecho que existe un pseudogen de esta proteína en la región q34.3 del cromosoma 9 humano (Data Bases *Entrez Gene* y *Ensembl*).

La regulación de la expresión de la  $\beta$ -lactoglobulina es dependiente de la estimulación celular por parte de hormonas lactogénicas y de factores de crecimiento. Esta estimulación depende de la acción sinérgica de prolactina, glucocorticoides e insulina.

*Proteína ácida del suero (WAP).*— Constituye una de las proteínas dominantes en numerosas especies. En un interesante trabajo sobre la existencia del pseudogen de la WAP en las células epiteliales de la glándula mamaria en la vaca, oveja y cabra, especies que se sabe no expresan la proteína, Hajjoubi *et al.* (2006) efectúan un listado de las especies mamíferas en las cuales se ha demostrado la presencia de esta proteína en la leche. La secreción de la WAP se ha demostrado en las siguientes especies: ornitorrinco y equidna (Monotremas), el possum cola de cepillo y el wallaby (Marsupiales), y entre los placentarios, en la rata, ratón doméstico, camello, conejo, y cerdo. En nuestro grupo de trabajo, se ha encontrado en los camélidos sudamericanos (Medina de Cáceres, 2009) una proteína con características vinculadas a la WAP.

Tiene una masa molecular bastante variable entre distintas especies, que va desde los 16 kDa hasta los 25 kDa. Se distingue de otras proteínas lácteas en el hecho de poseer un dominio característico rico en cisteínas el cual forma parte de un grupo diferenciado de proteínas conocido como *núcleos de cuatro disulfuros*. La WAP de los mamíferos euterios tiene dos de estos núcleos de 4 disulfuros. Como en el caso de las dos proteínas anteriores, ésta solamente se expresa en la glándula mamaria. Las WAPs de los marsupiales tienen tres núcleos 4 disulfuros, lo

mismo que el ornitorrinco, mientras que el equidna tiene dos.

Sobre la función de esta lactoproteína no hay ninguna hipótesis que goce de generalizada aceptación. En la ya citada publicación de Hajjoubi *et al.* (2006), se efectúa una revisión de las hipótesis sobre la posible función de la WAP. La más difundida fue la de una función inhibidora de una proteasa presente (o contaminante) en la leche; otra hipótesis se basa en una posible acción relacionada con la morfogénesis de la glándula mamaria basada en su capacidad de alterar el ciclo celular en cultivos de líneas celulares de ratón, lo cual se efectivizaría por disminución de la expresión de la ciclina D. Esta hipótesis recibe el interesante apoyo de haberse encontrado un receptor para la WAP en líneas celulares de ratón. Por último, se ha propuesto que la WAP pudiera haber tenido una función antimicrobiana dada la presencia de su estructura con 4 disulfuros. En otros contextos, estas funciones son mencionadas más adelante en relación a los aspectos evolutivos y generales de la WAP.

Hay que mencionar que estas estructuras repetitivas de algunas proteínas, consistentes en varios sectores idénticos o casi idénticos, se presentan no solamente en la WAP, sino también en varias otras proteínas. Hay una gran cantidad de información acerca de proteínas que se han originado y han evolucionado a través de mecanismos de duplicación génica y posterior mutación en una de las copias que pasa a constituir un nuevo gen. Asimismo la duplicación intragénica de un exón explica las estructuras repetitivas de las proteínas a las que nos referimos. Una consecuencia de ello es que estas estructuras, tal como se las observa actualmente, contienen generalmente la historia evolutiva de todo un grupo de proteínas actuales que conforman familias conspicuas a las que pertenecen. Estos aspectos son particularmente importantes en la evolución de las caseínas.

El cuadro evolutivo presuntivo se perfecciona a través del estudio de las estructuras de sus genes, sean éstos activos o silenciosos. Si son activos la expresión en sus productos proteicos nos proporcionan información sobre la función (eventual, si nuestro conocimiento no es completo) que llevan a cabo. Aún si los genes son silenciosos, y por lo tanto no existe una proteína que proporcione pistas acerca de su función, la similitud de su estructura puede informar sobre la función probable y sobre el tiempo transcurrido desde su silenciamiento. Como veremos, las caseínas presentan estructuras repetitivas y genes silenciosos.

Conviene mencionar que los cambios evolutivos descansan no solamente en la aparición de nuevos segmentos, sino también en la pérdida de algunos de ellos. No solamente se pueden ganar nuevos exones por duplicación, sino que se pueden perder por un proceso de mezclado que involucra a dos genes, en los cuales uno de ellos pierde un exón que puede incorporarse al otro. Para el caso de los genes de las WAP, este proceso explicaría las diferencias encontradas entre los monotremas, marsupiales y el resto de los euterios.

De los ya mencionados sectores de la secuencia de aminoácidos a los que se denomina *motivos*, muchos se distinguen por características especiales. Por ejemplo, algunos que son ricos en cisteínas, y que caracterizan a la WAP, han sido encontrados en varias otras proteínas o péptidos. Estas proteínas pertenecen a dos grupos de acuerdo a sus funciones: uno de ellos tienen la capacidad de inhibir proteasas y el otro se caracteriza porque son proteínas que actúan en los casos en que se lleva a cabo una remodelación de tejidos.

Se sabe que la regulación de la expresión de la WAP está claramente relacionada con la estimulación celular por parte de hormonas lactogénicas. Esta estimulación depende de la acción sinérgica de prolactina, hidrocortisona e insulina.

*Lactoferrina (Lf)*.— Esta proteína se encuentra en la sangre y en varios tejidos. En el caso de la glándula mamaria, su expresión varía según la especie. Tiene una masa molecular de 80 kDa aproximadamente y posee varios dominios distintos. La leche de algunas especies contiene transferrina en lugar de lactoferrina. La transferrina pertenece a la misma familia que la lactoferrina y ambas tienen una gran semejanza. La lactoferrina también se expresa en los neutrófilos donde está contenida en sus gránulos secundarios. Es conocida la capacidad de la esta proteína de unir hierro, y en este sentido es la proteína láctea con mayor capacidad para esta función.

La lactoferrina tiene reconocida actividad antimicrobiana, lo que ha sido atribuido en parte al secuestro de hierro que produce su depleción en el medio en que se encuentra, lo que conduce a su vez a la anulación de su utilización por las bacterias. Esta proteína capta los iones  $\text{Fe}^{3+}$ , generalmente en forma conjunta con el ión bicarbonato.

Otro efecto antimicrobiano probable puede estar relacionado

con la existencia en su estructura molecular de un dominio con efectos catalíticos de serina-proteasa. Este dominio se encuentra también en la molécula de la transferrina (data: *UPKB/SP*). Se le atribuye asimismo efectos antiinflamatorios y capacidad de contribuir a la regulación del crecimiento celular y la diferenciación.

La similitud de la lactoferrina de nuestra especie con la del chimpancé es de un 99%, mientras que con distintas especies de roedores la similitud está entre un 62 y un 76%.

Entre otras numerosas funciones (Extracto de *PubMed*, 2009) que se ha comprobado que la lactoferrina lleva a cabo, se encuentran:

- 1) Una serie de efectos primarios o asociados relacionados con la regulación de la actividad celular y tisular. Por ejemplo, el incremento de la formación de hueso, y la capacidad de inhibir la apoptosis de osteoblastos; la protección a los macrófagos mediante la disminución de la formación de radicales hidroxilos evitando el daño a sus membranas; la modulación de la proliferación y la diferenciación celular intestinal, asimismo la estimulación de curación de heridas y modulación de la inflamación; el control de los niveles y actividad de la proteína retinoblástica; la regulación de activación del gen p53 a través de la inducción de la cascada NF- $\kappa$ B; la protección de los glóbulos rojos contra el estrés oxidativo y la regulación de su metabolismo glicolítico; la inhibición de la actividad de serina-proteasas en la leche, juntamente con la  $\beta$ -Cn; una expresión proteica dependiente de estrógenos; capacidad (o necesidad) de responder a cambios de la morfología celular y de la actina del citoesqueleto para consumir su expresión.

- 2) En lo relacionado con actividades inmune innatas y con respuestas específicas de defensa encontramos: promoción y reclutamiento de células presentadoras de antígenos en las respuestas inmunes específicas; un papel definido en la capacidad de los polimorfonucleares en la inhibición del crecimiento de conidios de *Aspergillus fumigatus*, y efectos directos sobre la membrana de *Candida albicans*; actividad contra el virus de la hepatitis C a través de su unión a proteínas de membrana; efectos hidrolítico sobre proteínas de membrana específicas de *Haemophilus*; asistencia en la actividad de la microglia en la sustancia negra del tronco cerebral, para lo cual depende del factor de necrosis tumoral (TNF); asimismo se han encontrado aumentos de sus con-

centraciones en el líquido cerebro raquídeo en casos de meningitis, como asimismo en el líquido amniótico en las infecciones correspondientes; inhibición *in vitro* del virus del papiloma humano; también la capacidad de impedir la citoadherencia de *Plasmodium falciparum* a los eritrocitos; actividad antiparasitaria, conjuntamente con la lactoferricina, contra *Entamoeba histolytica*; inhibición de la penetración de citomegalovirus en fibroblastos; respuesta positiva, conjuntamente con la lisozima, a las bronquitis crónicas en las vías aéreas; se ha observado una relación, muy probablemente causal, entre los polimorfismos genéticos de esta proteína y la susceptibilidad a las periodontitis, al herpes simple y a las diarreas; inmunomodulación de células cebadas en la piel de equinos con hipersensibilidades a insectos micropredadores.

Como se puede observar, la mayor parte de las funciones y los efectos descritos corresponden a acciones que se llevan a cabo en la sangre, líquidos intersticiales y tejidos, de manera que su consideración y extrapolación a la leche o la luz gastrointestinal del lactante están limitadas. Incidentalmente y como información indicativa, se sabe que algunas de ellas podrían llevarse a cabo en la pared intestinal.

*Inmunoglobulinas.*— Los tres tipos de inmunoglobulinas (Igs) de mayor abundancia en el suero sanguíneo, IgA, IgG e IgM, también se encuentran en la secreción láctea. Las diferencias consisten sobre todo en que, varían sus presencias relativas a través de la lactación, como también es variable su concentración entre distintas especies. En este último caso, a diferencia con lo que pasa con otras proteínas de la leche, por ejemplo la  $\beta$ -lactoglobulina, de la cual su distribución taxonómica sigue un patrón hasta ahora difícil de interpretar —como lo es la existencia en algunos primates y no en la especie humana—, la presencia de los tipos de Igs en distintas especies está claramente relacionados con características biológicas constitutivas de cada una.

Los mecanismos de defensa más complejos, y en función de ello podemos decir más evolucionados, los presentan los mamíferos. En este contexto, las Igs representan las estructuras moleculares más avanzadas en cuanto a reconocimiento de sustancias que sean extrañas o potencialmente dañinas.

Cuando nace la cría, su sistema inmune no ha tenido expe-

riencia con las sustancias del mundo exterior y no ha generado moléculas específicas para enfrentarlas. Sí posee, en cambio, una serie de moléculas y mecanismos inespecíficos que reconocen los patrones moleculares estructurales que caracterizan a los distintos tipos de microorganismos. En este sentido son conocidas las funciones de péptidos antimicrobianos y de enzimas antibacterianas que también se hallan en la secreción láctea, tal es el caso de las  $\beta$ -defensinas entre los péptidos y de la lactoperoxidasa y lisozima entre las enzimas.

Las inmunoglobulinas que se encuentran en la sangre de los recién nacidos provienen de la madre, quien las transfiere a la cría en dos momentos distintos según los grupos zoológicos. La forma en que se transmiten las Igs, ya sea antes del nacimiento, o después del parto, depende del tipo de placenta que es propio de la especie. Las características que tienen las placentas entre los mamíferos siguen una distribución taxonómica muy clara. Los artiodáctilos tienen placentas epitelio-corial; los primates tienen placentas tipo hemocorial; los roedores las tienen de tipo endotelio-corial, etc. Las placentas de distintos tipos tienen distintos número de membranas y diferentes grados de permeabilidad para el paso de las grandes moléculas. Cabe aclarar que la permeabilidad a la cual nos referimos no está basada solamente en una cuestión física, sino también en un atributo biológico que necesita de mecanismos de transferencia celulares que implican la presencia de marcadores (transportadores) de membranas a los que se unen específicamente las Igs a través de sus fracciones Fc.

Aquellas especies que tienen placentas con menos capas embrionarias y son más permeables, transfieren las Igs a través de la placenta hacia la circulación de la cría durante la última parte de la gestación. Tal es el caso de nuestra especie y de otros primates que tienen placenta hemocorial permeable al paso de las Igs de tipo IgG. En estas especies, la secreción láctea es rica en IgA.

En el caso de las especies que poseen placentas con mayor número de membranas, y no son permeables a las inmunoglobulinas, éstas son transferidas al neonato en las primeras horas después del nacimiento y lo hacen a través del calostro que es mamado por la cría. Tal es el caso de los ungulados, por ejemplo los bóvidos y los équidos. En estas especies, la secreción láctea perinatal contiene una muy alta concentración de IgG.

Esta inmunoglobulina es absorbida en el intestino de la cría por un mecanismo que tiene características de pinocitosis y que capturan las Igs a través de su unión a receptores específicos a los cuales se une la fracción Fc de las Igs. Estas Igs pasan a la sangre del recién nacido. En estas especies, la leche madura contiene como inmunoglobulina dominante a la IgG. Las inmunoglobulinas de la leche provienen de la sangre o son producidos por linfocitos B o células plasmáticas residentes en la glándula mamaria.

*Lisozima.*— Como ya se ha mencionado, esta enzima se encuentra en la leche de algunos mamíferos y ausente en otros. En el caso de los camélidos, esta proteína no se expresa en las células secretorias de la glándula mamaria, aun cuando el gen correspondiente está presente. Cuando se encuentra actividad de lisozima en la leche de animales en los cuales esta proteína no se expresa en la glándula mamaria es porque proviene de polimorfonucleares que han penetrado a la luz alveolar.

La lisozima es una enzima ampliamente distribuida en los animales y las plantas. Su principal actividad consiste en la hidrólisis de los enlaces glicosílicos existentes entre los residuos alternantes que forman parte de la estructura de peptidoglicanos de las paredes bacterianas, actividad denominada también muramidásica. Esta hidrólisis conduce a la lisis de las células bacterianas. La enzima ha sido estudiada en virus, bacterias, plantas, protozoos, invertebrados y vertebrados. Dentro de éstos últimos ha sido especialmente investigada en los mamíferos. En éstos forma parte de los sistemas de defensa inespecífica de la secreción láctea (Jølles y Jølles, 1984; Fernández y Saad de Schoos, 1999; Ibrahim *et al.*, 2001) en la mayor parte de las especies estudiadas. Es pertinente mencionar que esta proteína también puede eliminar a las bacterias mediante un mecanismo no enzimático que consiste en la alteración funcional de la membrana celular, efecto que es independiente de la destrucción de la pared de péptidoglicano (Düring *et al.*, 1999; Ibrahim *et al.*, 2001; Gandhe *et al.*, 2007). Además de lo mencionado también se han identificado proteínas de una alta similitud con las lisozimas que tienen actividad bacteriostática pero sin efectos líticos sobre las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Gandhe *et al.*, 2007).

La determinación de la actividad muramidásica en los laboratorios se efectúa en la inmensa mayoría de los casos mediante el

método turbidimétrico o sea midiendo la lisis de una suspensión de bacterias susceptibles, habitualmente *Micrococcus luteus*, mediante la lectura de la disminución de la densidad óptica. La simplicidad y rapidez del método lo ha convertido en uno de los más utilizados, con gran variedad de propósitos (Jenzano *et al.*, 1986; McKenzie y White, 1986; White *et al.*, 1993; Bachali *et al.*, 2002; Gandhe *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2007; Jiménez-Cantizano *et al.*, 2008), en diferentes aplicaciones de la biología experimental y aplicada. Este método presenta problemas especiales que limitan su aplicación según se ha observado en nuestros laboratorios (Castro *et al.*, 2009).

Esta enzima también ha sido estudiada y medida utilizando sustratos solubles (hexa-metil-glucosamina; methylumbelliferyl-triacetyl-chitotriose, etc.) (Banerjee *et al.*, 1973; Yang y Hamaguchi, 1980; O'Brein y Colwell, 1987; Tsai, 1997; Eisenthal y Danson, 1993; Viallet *et al.*, 2002; Chongqiu y Luo, 2004). Con estos métodos se respetan los postulados de Michaelis-Menten, derivándose lícitamente los valores  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_{cat}$ , etc.

La lisozima es, probablemente, una de las más antiguas enzimas bacteriolíticas, según lo prueba su amplia distribución en los seres vivos. Es pertinente mencionar que varias de las lisozimas existente en distintas especies de plantas poseen actividad de quitinasa. En este sentido hay que mencionar que existen varias familias de quitinasas, y que solamente algunas de ellas están funcionalmente y estructuralmente relacionadas con las lisozimas (Suibroto *et al.*, 1999). Esta actividad estaría destinada a combatir a insectos, sus larvas, y sobre todo a hongos fitopatógenos (Martin, 1990). Las quitinasas hidrolizan la unión  $\beta$ -1,4 entre los restos de *N*-acetil- $\beta$ -glucosamina de la quitina que se encuentran en los hongos y el exoesqueleto de los insectos. En cambio, como se sabe, las lisozimas hidrolizan las uniones  $\beta$ -1,4 entre *N*-acetil-D-glucosamina y ácido murámico de los peptidoglicanos bacterianos. Adicionalmente debemos mencionar que existen en diversas especies de plantas varias isoenzimas con actividades quitinasa/lisozima; algunas mayormente inclinadas a los efectos sobre quitinas y otras actúan con mayor eficiencia sobre las paredes bacterianas.

En los mamíferos existen por lo menos dos genes distintos que codifican para lisozima. En el ratón se encuentran los dos, denominados M y P, mientras que en nuestra especie se encuentra la forma M. Desde el punto de vista de la estructura se han

clasificado a las lisozimas animales en tres grandes familias: lisozima c (chicken), g (goose) y lisozima i (invertebrate), siendo esta última particularmente variada (Xue *et al.*, 2007).

Además de las actividades destinadas a la defensa contra microorganismos, hongos e insectos, la lisozima tiene en numerosas especies la función de formar parte de los mecanismos digestivos. Con este sentido es segregada por el epitelio intestinal en animales que poseen una dieta fundamentalmente herbívora la cual mantiene una amplia y variada población simbiótica microbiana intestinal, constituida sobre todo por bacterias y protozoos, que colabora en la digestión de las hojas y frutos ingeridos. Esta población está en continuo y activo crecimiento y es digerida casi íntegramente en sectores más distales del tracto gastrointestinal del organismo para aprovechar los aminoácidos, glúcidos y otros compuestos sintetizados por los simbioses a partir de los vegetales. La lisozima segregada con los jugos entéricos juega un papel central en la destrucción de las bacterias simbióticas.

Además de los rumiantes típicos, este mecanismo se encuentra en monos y aves herbívoras, e incluso debe haber sido utilizado por los dinosaurios (Dobson *et al.*, 1984; Mackie, 2002). Es interesante mencionar que la lisozima ortóloga del chimpancé es idéntica 100% en su secuencia de aminoácidos a la enzima humana (data *HomoloGen*); las correspondientes de los roedores tienen una similitud media de un 75% con la de nuestra especie.

*La lactoforina o Componente 3 de las proteosas peptonas.*— Esta proteína que fue conocida por el nombre resultante de un procedimiento de aislamiento de lactoproteínas, ha sido hallada y estudiada en la leche de vaca (Anderson, 1981) donde forma parte de la fracción de las proteosas peptonas. También fue hallada en la leche de cabra (Lister *et al.*, 1998). Asimismo ha sido encontrada en leche de camella (Beg *et al.*, 1987) y de oveja. Nuestro grupo de trabajo ha detectado en la leche de vicuña una proteína que tiene características que inducen a pensar que se trata de la lactoforina.

Es una proteína que en la leche bovina tiene una masa molecular de unos 15 kDa, está unida a través de serinas a cinco grupos fosfatos y está glicosilada en tres lugares. Se ha comprobado que tiene una cierta acción inhibidora de la lipólisis y que forma parte de la membrana de los glóbulos grasos. A partir de la información de la literatura sobre proteínas de la leche se

desprende que, si bien es una proteína que se presenta en concentraciones fácilmente detectables, solamente ha sido mencionada en pocas especies.

## LAS CASEÍNAS

Las caseínas han sido ampliamente descriptas y estudiadas en la leche bovina. De este origen es en gran parte la información existente y, en general las caseínas de leche de vaca se toman como referencia para homologar las caseínas de las otras especies de mamíferos (Eigel *et al.*, 1984). En la última década la información sobre genética molecular concerniente a este grupo de proteínas se ha acumulado principalmente a partir del estudio de las especies animales de laboratorio.

Dentro del estudio de las caseínas interesan varios aspectos, estructurales, fisiológicos, evolutivos, y ecológicos, en este último punto, sobre todo en lo que incumbe a influencia del medio en la lactación y sobre los componentes de la leche. Dentro del campo fisiológico, incluimos lo relacionado con la síntesis y secreción de los componentes lácteos.

Las caseínas son proteínas relativamente poco estructuradas. Su elevado contenido de prolina hace que las cadenas polipeptídicas no puedan adoptar fácilmente las conformaciones espaciales necesarias para formar las  $\alpha$ -hélices y hojas  $\beta$ -plegadas características de la estructura secundaria de la mayor parte de las proteínas.

En la leche bovina se han descrito cuatro caseínas principales:  $\alpha_{S1}$ -caseína,  $\alpha_{S2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína. De hecho, todo parece indicar que en los mamíferos euterios placentados solamente existen cuatro genes distintos que codifican para este grupo de lactoproteínas. Esta aclaración de referencia a los euterios placentarios es pertinente porque el conocimiento de las caseínas es insuficiente en las especies pertenecientes al grupo de los marsupiales y los monotremas. Es necesario mencionar que entre los placentados, la información existente sobre insectívoros y edentados tampoco es muy amplia.

En los marsupiales, la  $\beta$ -caseína, si bien es una caseína calcio sensible, no sería homóloga de la  $\beta$ -caseína de los euterios (Kawasaki y Weiss, 2003). Por otra parte, en la leche de los armadillos y de osa hormiguera hemos encontrado características

distintas a las correspondientes a otras especies de mamíferos (Hernández de Sánchez, 2008).

Aún dentro de los Euterios, el conocimiento de las caseínas muy probablemente se limite a no más de un 2% de todas las especies existentes, y aún dentro de este porcentaje, solamente un 20% correspondería a la información sobre homologías constatadas mediante secuenciación de los genes involucrados. De ello se deduciría que únicamente sobre un 0,5 % de las especies conocidas de mamíferos existe información relacionada con los genes de caseínas que sea utilizable en los análisis filogenéticos.

Dentro de este panorama, y aún suponiendo una homología estructural de las caseínas de un 100% dentro de los Géneros, lo cual es aceptable dadas las circunstancias, quedaría seguramente más de un 95% de información sobre los tipos de caseínas y sus relaciones que es desconocida.

Además de las proteínas intactas que se encuentran en la secreción láctea es necesario mencionar algunas formas menores que se originan a partir de la proteólisis de las caseínas primarias por acción de proteasas presentes en la leche, y sean éstas indígenas o pertenecientes a microorganismos invasores. Entre estas proteasas se encuentra la plasmina, derivada del plasminógeno, componente normal en la leche de gran número de especies. La plasmina se origina por activación de dicha proenzima. La plasmina ataca a la  $\beta$ -caseína y a las  $\alpha$ -caseínas. Los polipéptidos resultantes de la proteólisis incluyen a la g-caseína, a las proteasas peptonas, derivadas de la  $\beta$ -caseína (Egito *et al.*, 2002), y a la l-caseína, derivada de la  $\alpha_{S1}$ -caseína (Fox, 1982). Nuestros trabajos con caseínas de vicuña demuestran la presencia prácticamente constante de estas bandas menores correspondientes a péptidos de la  $\beta$ -caseína (Ruiz de Bigliardo *et al.*, 2007).

Las caseínas pueden presentar heterogeneidad debida a varias causas, entre las cuales se distinguen:

- a) la variación en el grado de fosforilación, circunstancia que afecta a las caseínas calcio-sensibles;
- b) glicosilación, variación que se presenta casi exclusivamente en la  $\kappa$ -caseína;
- c) la polimerización por medio de uniones disulfuro, situación que no involucra a la  $\beta$ -caseína según se verá más adelante;
- d) el polimorfismo genético debido a la existencia de alelos, variación que puede encontrarse en todos los tipos de caseínas.

Cabe aclarar que hasta ahora los polimorfismos genéticos que

se han estudiado en este grupo de proteínas corresponden en un 90% a las especies domesticadas y de laboratorio. Estas variaciones genéticas se conocen en profundidad entre los bóvidos lecheros, no así en los mamíferos silvestres, lo cual se basa en la circunstancia, bastante obvia y ya mencionada, de que la obtención de los datos poblacionales que se necesitan está obstaculizada por la accesibilidad al objeto de estudio. En este sentido la mayor parte de los datos existentes corresponden a la información que se consigue en los zoológicos, o en reservas biológicas con adecuada infraestructura. Esta última condición solamente se cumple para unas pocas especies de mamíferos.

Por otra parte, los datos que se obtienen a partir de tomas de muestras a campo tienen la desventaja de desconocer la información acerca del parentesco entre los animales de los cuales se obtienen las muestras.

Como se ha dicho, salvo la  $\kappa$ -caseína que tiene un fosfato, todas las caseínas están fosforiladas en grado variable. En los bovinos, la  $\alpha_{S1}$ -caseína tiene ocho moles de fosfato por mol de proteína. En la  $\alpha_{S2}$ -caseína, esta relación molar se encuentra entre diez y trece, y en la  $\beta$ -caseína puede ser hasta cinco moles de fosfato por mol de proteína.

Sörensen *et al.* (2003) han encontrado un patrón de fosforilación de la  $\alpha_{S1}$ -caseína de la leche humana marcadamente diferente a la correspondiente de los bovinos. La mencionada caseína humana posee tres variantes en cuanto a la fosforilación: una forma no fosforilada, una monofosforilada y otra bifosforilada. Es interesante el hecho que los sitios en que se encuentran los fosfatos no se corresponden en su secuencia con aquellos de los de la caseína bovina homóloga. La  $\beta$ -caseína humana presenta seis bandas electroforéticas que corresponden a seis péptidos que tienen de cero a cinco grupos fosfatos por molécula cada uno (Sood y Slattery, 2001).

La  $\kappa$ -caseína es la menos fosforilada de los cuatro tipos, en todas las especies en las que se la ha estudiado. Ésta contiene solamente 1 mol de P por mol de proteína. Los grupos fosfatos de las caseínas constituyen el nexo de unión y retención al calcio y fosfato de calcio inorgánico (Rasmussen *et al.*, 1997), lo cual permite que las micelas de caseínas tengan la cantidad más importante de fosfato de calcio entre las estructuras biológicas, con excepción de las proteínas que forman parte de la matriz ósea.

En la sección referida a los orígenes filogenéticos de las moléculas de caseínas, volveremos a la relación existente entre los genes de caseínas y los correspondientes a otras proteínas fijadoras de calcio.

## LOS POLÍMEROS DE CASEÍNAS

Tres tipos de caseínas,  $\alpha_{s1}\text{Cn}$ ,  $\alpha_{s2}\text{Cn}$ , y  $\kappa\text{-Cn}$ , tienen la capacidad de formar puentes disulfuro intermoleculares debido a la presencia de cisteínas en su secuencia aminoacídica. La  $\alpha_{s2}$ -caseína de los bóvidos contiene dos cisteínas por molécula y puede aparecer en la leche en forma de dímeros formando puentes disulfuro intermoleculares (Fox, 1982; Farrell *et al.*, 2004). El alineamiento de las cadenas puede ser tanto paralelo como antiparalelo (Rasmussen *et al.*, 1999). Esta circunstancia sobre la posición de las moléculas que se unen en dos disposiciones distintas pone de manifiesto que no existen limitaciones rigurosas en la conformación respectiva al momento de establecerse la unión.

La existencia de una sulfhidril-oxidasa en la leche explica la tendencia a formar los oligómeros de caseínas que se encuentra en la mayor parte de las especies estudiadas (Hernández de Sánchez, 2008). Talbot y Waugh (1970) y Slattery (1978) ya habían atribuido la existencia de polímeros de  $\kappa$ -caseína, cuyos monómeros están unidos por puentes disulfuro, a dos causas que pueden o no ser concurrentes. La primera, a la que podemos llamar tecnológica, se refería a la oxidación por exposición al aire después del ordeño. La segunda causa, que naturalmente produce sus efectos en la secreción láctea, se debe a la acción de —por lo menos— una enzima, la sulfhidril-oxidasa (SOX). Esta enzima ha sido purificada a partir de la leche de vaca (Janolino y Swaisgood, 1975) y de la leche humana (Hamosh, 1995). Es una metalo-proteína que contiene hierro, y aparentemente se encuentra vinculada a la membrana del glóbulo graso. Se sabe que cataliza la oxidación de los grupos sulfhidrilos usando  $\text{O}_2$  como oxidante, produciendo cantidades equimolares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el disulfuro intramolecular correspondiente. Esta enzima denominada también Quiescín Q6, tiene una masa molecular de aproximadamente 81 kDa. Como una ampliación de los conocimientos en el tema, Jaje *et al.*, (2007) han descrito otra enzima presente en la leche de vaca que tiene actividad de sulfhidril-oxidasa. Esta forma en-

zimática tiene una masa de 62 kDa, pertenece a la familia de sulfhidril-oxidasa, pero no es una metalo-proteína, sino flavina-dependiente. La actividad de la sulfhidriloxidasa se expresa en varios tejidos de la economía de los Vertebrados cumpliendo funciones relacionadas con la formación de puentes disulfuro intracatenarios.

La SOX ha sido estudiada en la piel humana (Yamada *et al.*, 1987; Yamada *et al.*, 1994), en las células testiculares humanas (Aumuller *et al.*, 1991) y en la clara de huevo de gallina (Hoover *et al.*, 1996; Hoover *et al.*, 1999).

La secuenciación de las aminoácidos de la  $\alpha_{s1}$ -caseína de la leche humana ha demostrado que ésta posee tres cisteínas (Cis<sub>75</sub>, Cis<sub>99</sub> y Cis<sub>104</sub>). Dos de ellas permiten que puedan formarse polímeros de  $\alpha_{s1}$  por medio de puentes disulfuro intercatenarios dejando una cisteína restante que podría unirse con la  $\kappa$ -caseína (Johnsen *et al.*, 1995).

La  $\kappa$ -caseína bovina contiene dos cisteínas por molécula (Cis<sub>11</sub> y Cis<sub>88</sub>). La información existente indica que esta caseína se presenta en bóvidos en la forma de polímeros de longitud variable, en una distribución de tamaño que va desde dímeros a decámeros (Talbot y Waugh, 1970). Cabe recordar que prácticamente toda la bibliografía sobre los oligómeros de caseínas se restringe a lo conocido en cuatro especies, de las cuales tres son bóvidos (vaca, cabra oveja), y la especie humana.

A partir de la información existente cabía suponer que la multimerización de las caseínas podría llevarse a cabo mediante procesos que impliquen:

- a) distintos modelos en la misma especie, o bien
- b) un patrón que genere oligómeros con variado número de monómeros, o
- c) siguiendo una secuencia de polimerización que conduzca a la aparición de oligómeros con un número creciente de unidades, o
- d) que genere oligómeros con un número fijo de moléculas de caseínas.

Otra cuestión no resuelta consistía en determinar si existen tendencias a formar los oligómeros con uno, o más tipos de caseínas.

Como veremos más adelante y a partir del estudio que hemos llevado a cabo sobre los oligómeros de caseína, lo que parece claro es que cada especie tiene un patrón propio en lo que respecta a la estructura y constitución numérica de cada oligómero.

Según Rasmussen *et al.* (1999), los grupos sulfhidrilos de las cisteínas que no están involucrados en la formación de polímeros no están libres, ni unidos a otros compuestos tiólicos pequeños, sino que se encuentra formando uniones intracatenarias. La aclaración es pertinente porque ello demostraría que existe un oportunismo por parte del sistema en aprovechar, dentro de cada molécula, todas las posibilidades de establecer uniones.

Cabe señalar que otras proteínas de la leche también pueden intervenir en la formación de los oligómeros, los cuales para el caso corresponderían a hetero-oligómeros. En la vaca, la  $\kappa$ -caseína además de formar homopolímeros, también puede formar puentes disulfuro con la  $\alpha$ -lactalbúmina y con la  $\alpha_{S2}$ -caseína (Fox, 1982).

La medida en que lo hicieran y en cuales condiciones era una cuestión abierta. Relacionado con lo anterior cabe mencionar que los procedimientos tecnológicos en lactología han permitido conocer que, cuando la leche es sometida a calentamiento, la  $\kappa$ -caseína puede unirse a la  $\beta$ -lactoglobulina (Euber y Brunner, 1982; McLean y Schaar, 1989). En todas las especies en las que ha sido estudiada, la  $\beta$ -caseína carece de cisteína, por lo que no puede formar puentes disulfuro con ninguna otra proteína (Fox, 1982).

De los cuatro tipos de caseínas, la  $\kappa$ -caseína es la única que está glicosilada. Esta proteína es hidrolizada por la enzima quimosina, la cual cliva la molécula en el enlace Fenilalanina<sub>105</sub>-Metionina<sub>106</sub> (F<sub>105</sub>-M<sub>106</sub>), generando dos polipéptidos, uno hidrofóbico N-terminal, denominado *para- $\kappa$ -caseína* y otro hidrofílico, C-terminal que está fosforilado y glicosilado, el *caseinomacropéptido* (CMP).

El CMP es muy heterogéneo y contiene todos los sitios en los cuales se producen modificaciones postraduccionales de glicosilación y fosforilación de la  $\kappa$ -caseína original (Malkoski *et al.*, 2001). Se ha visto que hay variación en el grado de glicosilación que exhibe el CMP de las distintas variantes genéticas de  $\kappa$ -caseína, tanto en la leche de vaca como en la de cabra (Robitaille *et al.*, 1991).

También existen diferencias entre especies (humana, vaca, cabra y oveja) en cuanto a la estructura de los glúcidos unidos a la  $\kappa$ -caseína (Robitaille *et al.*, 1991; Brody, 2000). Por ejemplo, en la especie humana no se encuentra N-glicolil-neuramínico, uno de los tipos de ácido siálico, el cual sí se encuentra presente en otros mamíferos. Aparentemente ello se ha producido a

partir de una mutación de la enzima CMP-acido siálico hidroxilasa que cataliza la conversión del N-acetilneuramínico a N-glicolilneuramínico (Brinkman-Van der Linden *et al.*, 2000). Este cambio de la especificidad de la enzima debe haber ocurrido en el tronco de la Familia de los Homínidos porque sí se la encuentra en los grandes monos.

## LAS MICELAS DE CASEÍNA

Las micelas de la leche son partículas multimoleculares complejas constituidas en su mayor parte por proteínas, fundamentalmente las caseínas, y por una parte importante de calcio y de fosfato de calcio. Su función principal es la de proporcionar a la cría lactante los aminoácidos correspondientes y los nutrientes inorgánicos mencionados necesarios para la formación del esqueleto.

Según Walstra y Jenness (1989), la dificultad de “diseñar” las micelas de caseínas radica en que deben contener una parte de material, que aislado es muy insoluble (el fosfato cálcico), por una parte y, al mismo tiempo, que las caseínas calcio-sensibles deben ser estables, es decir que no deben precipitar, y no deben ser demasiado grandes. La tendencia a precipitar se debe a la presencia de gran cantidad de calcio en el medio acuoso del lactosuero, por una parte y a la naturaleza hidrofóbica de las caseínas  $\beta$ ,  $\alpha_{s1}$ , y  $\alpha_{s2}$ .

Por otro lado, cuando se encuentran en el estómago de la cría, las caseínas forman un coágulo por la acción de la quimosina y el medio ácido. Existe un consenso general en suponer que tal coagulación es asimismo importante. A nuestro criterio, este es un problema que permanece abierto; fuerza es mencionar que, para cualquier otro tipo de proteína se acepta la situación mas bien contraria, que a partir de componentes que son insolubles en primeras instancias se van generando durante la digestión componentes que son más dispersos y solubles. Las condiciones antes mencionadas a las que debe atender la micela de caseína son bastante conflictivas y pueden explicar lo complicado de su estructura.

Si bien ha sido estudiado con bastante profundidad en la leche bovina y humana, el mecanismo preciso de formación de las micelas de caseína no ha sido completamente dilucidado. Además, un modelo general del arreglo espacial de las caseínas en

las micelas no ha sido aún completamente establecido. Probablemente una de las razones estriba en el hecho que los modelos se construyen a partir de ensayos y datos experimentales que se llevan a cabo sobre las micelas de especies determinadas de mamíferos (como no podía ser de otra forma), y las diferencias de origen complican la solución.

La agregación de las caseínas en las micelas se inicia dentro del aparato de Golgi y continúa durante el transporte hacia la membrana apical de la célula secretoria del alvéolo mamario. A partir de los trabajos de Chanut *et al.* (1999) se sabe que la  $\alpha_{s1}$ -caseína es requerida para el transporte eficiente de las otras caseínas desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi. Según estos investigadores, la anulación de la síntesis de esta caseína en la glándula mamaria en la cabra produce supresión de la secreción y de la lactación. Este hallazgo del efecto permisivo de la  $\alpha_{s1}$ -caseína sobre la adecuada expresión de las otras caseínas ha significado un paso importante en la comprensión de la interdependencia que guardan los procesos de síntesis de varias proteínas lácteas con el mecanismo general de la lactación, pero para poder generalizar sobre esta función es necesario un conocimiento más acabado respecto a lo que ocurre en un espectro más amplio de especies.

Se han propuesto varios modelos sobre la estructura de las micelas de caseína basados en las propiedades químicas y físicas de las caseínas aisladas. La existencia de varias hipótesis al respecto proporciona una idea de la complejidad del problema.

En lo que sigue presentamos los modelos más difundidos en la literatura sobre el tema estructural. El modelo de Parry y Carroll (1969) es el más controvertido. En él se propone la existencia de grandes agregados de  $\kappa$ -caseína, unidos por interacciones disulfuro, en dos localizaciones dentro del sistema lácteo: una cierta proporción de la  $\kappa$ -caseína oligomérica estaría libre en el lactosuero asociada a pequeñas cantidades de  $\alpha_{s1}$ -caseína y  $\beta$ -caseína. De esta manera, estas moléculas serían las más accesibles para el ataque de la quimosina y por lo tanto las responsables de la iniciación de la coagulación de la leche. El resto de la  $\kappa$ -caseína actuaría como agente de nucleación para las caseínas sensibles al calcio, formándose grandes conglomerados. El calcio insoluble uniría todo el sistema de las caseínas dando cierta rigidez a las micelas formadas. En este modelo, la mayor parte de la  $\kappa$ -caseína estaría concentrada en el centro de la micela.

El modelo propuesto por Talbot y Waugh (1970) representa la micela como la distribución en un agregado central de  $\alpha_{S1}$ -caseína y  $\beta$ -caseína unido por medio de las interacciones con el calcio, y en la cual la  $\kappa$ -caseína actuaría como coloide estabilizador en la superficie del conglomerado, recubriendo toda la micela. Este modelo tiene el mérito de haber colocado a la  $\kappa$ -caseína en el exterior de la micela, patrón de configuración que se ha utilizado en la mayor parte de las hipótesis posteriores.

Dalgleish (1998) propuso que las micelas se comportan como coloides y las comparó con sistemas coloidales (tales como microgotas de emulsiones y partículas de látex), cuyas superficies estaban cubiertas por monocapas de proteína adsorbidas, ya sea por un solo tipo o una mezcla de ellas. En este modelo las moléculas de  $\kappa$ -caseína se encontrarían en la superficie pero no la cubrirían en forma homogénea. El modelo sostiene que las moléculas de esta caseína forman polímeros, unidos por puentes disulfuro, de diferentes tamaños, de tal manera que quedan poros por los que pueden penetrar, o salir, otras moléculas. Esta capacidad de intercambio entre las micelas y el lactosuero incluye también a la  $\beta$ -caseína, de la cual se ha observado que puede salir y entrar de la micela, según descienda o aumente la temperatura.

En el sistema humano, la fracción de caseínas sensibles al calcio contiene muy poca cantidad de  $\alpha_{S1}$ -caseína (Rasmussen *et al.*, 1995), constituyendo la  $\beta$ -caseína el 99 % de las caseínas calcio sensibles. Durante un tiempo se consideró que aparte de la  $\kappa$ -caseína, la  $\beta$ -caseína era la única presente en la leche materna de nuestra especie. El hallazgo de la  $\alpha_{S1}$ -caseína y la completa secuenciación de su gen aportaron una información capital en la comprensión de los mecanismos de la síntesis proteica de la célula epitelial secretora. A partir de la información actual sobre la composición caseínica de las micelas en nuestra especie no parece que la  $\alpha_{S1}$ -caseína juegue un papel decisivo en el mantenimiento de la estructura de las micelas.

La  $\beta$ -caseína es una proteína con diferentes grados de fosforilación: desde 0 ( $\beta$ -caseína 0P) a 5 ( $\beta$ -caseína 5P). Dado que más de un 90% de las proteínas de las micelas correspondía a la  $\beta$ -caseína, la importancia eventual que esta variación podría tener con la estructura micelar o a su estabilidad, constituyó una especie de enigma. Debemos mencionar que la  $\beta$ -caseína no es la única que posee un grado variable de fosforilación, las  $\alpha_s$ -caseínas también lo exhiben. El posible efecto del grado de fosfo-

rilación de la  $\beta$ -caseína y del grado de glicosilación de la  $\kappa$ -caseína sobre la formación de la micela en la leche humana, ha sido estudiado por varios grupos de investigadores (Dev *et al.*, 1994; Sood *et al.*, 1992; Sood y Slattery, 2001; Sood *et al.*, 2003). Todos ellos llegaron a la conclusión que la  $\kappa$ -caseína ocupa una posición superficial en la micela y por lo tanto puede regular el tamaño de la misma por su abundancia relativa. De hecho, al disminuir el tamaño de la micela aumenta en forma relativa la superficie respecto al volumen.

Actualmente, los resultados de estas investigaciones y otras vinculadas con el tema sugieren que el alto grado de glicosilación de la  $\kappa$ -caseína humana puede proteger una gran superficie y permite la formación de las micelas más pequeñas. Por otra parte las investigaciones mencionadas también revelaron que, aparte de las interacciones hidrofóbicas entre las dos caseínas ( $\beta$  y  $\kappa$ ), los grupos cargados positivamente de la  $\kappa$ -caseína pueden interactuar con los fosfatos cargados negativamente de la  $\beta$ -caseína.

Según Ould Eleya *et al.* (1995), quienes ponen el acento sobre la existencia de submicelas integrantes de las micelas, se observa que en la leche de vaca, cabra y oveja, las submicelas parecen ser similares, pero las micelas que éstas conforman son diferentes. Las micelas caprinas tienen un espectro de tamaños mayor que las bovinas y ovinas. Las micelas ovinas tienen una distribución de tamaño más estrecha y las partículas son más pequeñas (alrededor de 80 nm de diámetro).

Todas las leches de los mamíferos estudiados hasta el momento tienen por lo menos una caseína homóloga a la  $\kappa$ -caseína bovina y otra homóloga a la  $\beta$ -caseína bovina. Con respecto a esta circunstancia conviene recordar que si se comprobara en un número amplio de especies que la presencia de la  $a_{S1}$ -caseína es necesaria para la exportación del resto de las caseínas es una condición imprescindible, entonces serán, por lo menos, tres las caseínas que se expresan en la secreción láctea de los euterios.

Se sabe que las interacciones caseína-caseína en la formación de las micelas probablemente sean el resultado de un balance entre la repulsión electrostática y las interacciones hidrofóbicas. Las moléculas de caseína contienen un número significativo de ésteres fosfatos y si bien tienen una carga neta negativa, tienen una gran cantidad de distintas cargas (+ y -) y todo un rango de valores de electronegatividad, debidas a los aminoácidos, como

así también varios tipos de uniones (hidrofóbicas, de Van der Waal, electrostáticas, uniones de hidrógenos etc.)

Todo ello les permite una interesante interacción con otros péptidos y moléculas a partir de lo cual el conjunto gana en estabilidad. Sobre estos otros péptidos y moléculas volveremos en la sección en que trataremos sobre las proteínas asociadas a las micelas de caseína.

El sistema permite que las cargas netas negativas sean neutralizadas por la unión con  $\text{Ca}^{2+}$  o por una disminución en el pH. En este caso, las interacciones hidrofóbicas adquieren mayor relevancia y ello explica que las moléculas de caseínas sean “calcio-sensibles”. En ausencia de un factor estabilizante estas caseínas sensibles al calcio forman grandes partículas y precipitan.

Un incremento en el pH aumenta la carga neta negativa y previene su precipitación. Una disminución de la temperatura por debajo de la correspondiente a la de la glándula mamaria produce el mismo efecto porque reduce las interacciones hidrofóbicas.

Las micelas se forman cuando está presente un factor estabilizante, para el caso en la forma de una proteína glicosilada, que contiene una porción hidrofóbica. Además requiere que no sea precipitada por el calcio y se encuentre en una concentración tal que, cuando interactúa con el complejo caseínico para formar una superficie no reactiva, el conjunto pueda constituir una suspensión coloidal. Como es sabido, este papel lo cumple la  $\kappa$ -caseína.

En lo que se refiere a la presencia de los distintos tipos de caseína en la leche de diferentes especies hay indicios para considerar que la  $\alpha_{s1}$ -caseína podría ser constitutiva como ya se ha mencionado en cierto número de especies, puesto que se ha visto que se la necesita para que se produzca la (proporcionada) exportación de las micelas de caseína fuera del retículo endoplasmático rugoso (Chanat *et al.*, 1999).

La necesidad de contar con una adecuada cantidad de  $\alpha_{s1}$ -caseína, se pondría en evidencia claramente en aquellas especies que, en virtud de la presencia de algunos de sus alelos (Null, 0) son muy deficitarias en esta proteína, y ven claramente comprometida la exportación del resto de las caseínas calcio-sensibles. No está claro si esta condición de presencia de la citada caseína aparentemente tiene la exigencia de un tamaño molecular condicionante dado que en la cabra existen variantes genéticas de este

tipo de caseína con distintas masas moleculares (Bevilacqua *et al.*, 2002). Esta caseína interactúa con las otras caseínas en el RER formando un complejo que resulta necesario para el transporte eficiente a través del Golgi (Chanat *et al.*, 1999). Probablemente lo mencionado sea un caso especial inherente a la especie, que puede involucrar una dependencia cuantitativa del efecto observado, puesto que en la especie humana la concentración de  $\alpha_{s1}$ -caseína es muy pequeña y sin embargo la exportación de  $\beta$ -caseína es adecuada.

## LAS MICELAS Y LOS POLÍMEROS DE CASEÍNA

Históricamente, las uniones disulfuro no fueron consideradas de importancia primaria en la estructura y estabilidad de las micelas de caseína. Este concepto proviene de trabajos como el de Talbot y Waugh (1970) que sugirieron que la polimerización de la  $\kappa$ -caseína estaba limitada por sus niveles de glicosilación, mostrando además que las  $\kappa$ -caseínas SH (reducidas) monoméricas eran igualmente efectivas en la formación de micelas. Farrell y Thompson (1988) sugirieron una relación inversa entre el tamaño de la micela de caseína y el contenido de  $\kappa$ -caseína y encontraron que las micelas más grandes contenían los polímeros más grandes de  $\kappa$ -caseína. Ello podría indicar que las interacciones  $\kappa$ -k son mayores en las micelas que tienen menos concentración de este tipo de caseína, lo cual parece un problema abierto.

La distribución de la  $\kappa$ -caseína en la superficie micelar no es homogénea debido a que esta caseína se presenta como una mezcla de polímeros con diferentes grados de polimerización, por lo menos en algunas de las teorías y algunas de las especies. De esta manera la superficie micelar probablemente contenga islas de  $\kappa$ -caseína intercaladas con otras caseínas. Tal descripción de la superficie de la micela sugiere una posible explicación para un número de reacciones que se producen en las mismas. Por ejemplo, una distribución predominantemente superficial, o sea periférica, explicaría un acceso relativamente fácil de la quimosina a los sitios de las micelas en que se encuentra la  $\kappa$ -caseína. Ello ocurre en el tracto intestinal del lactante durante el proceso de la digestión.

Según veremos más adelante, la variabilidad llama la atención: nuestros hallazgos demostraron que en algunas especies solamente se presentan dímeros o trímeros de las caseínas que forman los oligómeros, en otras especies solo se expresan oligómeros de gran peso molecular. Es decir que no existe una expresión generalizada de una mezcla de oligómeros con distintos grados de polimerización.

Asimismo, a partir de la idea de esta distribución de los polímeros de  $\kappa$ -caseína en forma de islas en la superficie de la micela, se ha encontrado explicación para algunas reacciones que tienen importancia desde el punto de vista tecnológico. Ello es interesante por el hecho que la teoría coincide con lo que se encuentra en la leche de las tres especies de bóvidos lecheros.

Durante el calentamiento de la leche, para asegurar su calidad en lo referente a destrucción de microorganismos, se producen varios procesos. El efecto más obvio es la desnaturalización de las proteínas del lactosuero, las cuales sufren cambios conformacionales. En la leche de vaca, la  $\beta$ -lactoglobulina se despliega y exterioriza un grupo tiol reactivo que puede formar uniones disulfuro con los grupos tioles expuestos de la  $\kappa$ -caseína y a través de puentes disulfuro realizar reacciones de intercambio con la misma (Vasbinder *et al.*, 2003). Por ello, el calentamiento de la leche resulta en la formación de una compleja mezcla de agregados de proteínas del lactosuero y caseínas que le otorga a la leche mayor estabilidad.

Si la capa molecular de “pelos” —constituidos por las cadenas de glúcidos de la  $\kappa$ -caseína— en las micelas es difusa o tiene hendiduras, debido a la distribución de la  $\kappa$ -caseína sobre la superficie micelar, la difusión de otras proteínas, entre ellas las del lactosuero, puede ser fácil y sin obstáculos.

Además en la leche de vaca, durante el enfriamiento (alrededor de los 4°C) la  $\beta$ -caseína puede salir de la micela por las hendiduras de la superficie, lo cual es permitido por la mencionada distribución periférica de la  $\kappa$ -caseína. Esto, por el contrario, no sucede en la leche porcina, en la cual se disocia muy poca o ninguna  $\beta$ -caseína de la micela al disminuir la temperatura (Gallagher *et al.*, 1997).

Como se puede apreciar la teoría de base y de aplicación tecnológica es correcta toda vez que tiene en cuenta lo que se sabe sobre las leches pertenecientes a las especies de utilidad industrial.

## ACERCA DE LAS ESTRUCTURAS SECUNDARIA Y TERCIARIA DE LAS CASEÍNAS Y DE SUS ASOCIACIONES MUTUAS

La experiencia y el constante (y relativamente lento) avance sobre el conocimiento de la estructura de las caseínas han conducido a una situación actual en la cual se puede intentar válidamente una descripción de estas proteínas y de las micelas que explique su particular naturaleza. Como veremos, la creciente información sobre las estructuras de las proteínas en general autoriza a afirmar en este momento que la innegable relación existente entre estructura y función en estos polímeros no significa necesariamente suponer que la denominación (para el caso estructuras secundarias y terciarias) implica la existencia de una estructura concreta, ordenada, y plegada.

Las caseínas son proteínas no estructuradas, insuficientemente plegadas, en las que no ha sido posible conocer su disposición tridimensional por la imposibilidad de lograr cristalizarla. Además tienen una fuerte tendencia a asociarse entre ellas de diferentes maneras, e incluso a formar oligómeros en forma covalente (salvo la  $\beta$ -caseína) siguiendo patrones no identificados. Una de las peculiaridades de las caseínas ligadas con las mencionadas características es la gran cantidad de prolina existente en su secuencia aminoacídica.

Todo ello ha impedido la dilucidación de una estructura permanente que permita atribuir funciones diferenciales a los diferentes tipos de plegamientos eventualmente existentes (hélices  $\alpha$ , láminas  $\beta$ , giros  $\beta$  cortos, o largos) y a los dominios identificables. En este sentido, los mayores, y casi únicos, aportes han surgido de los campos de investigación relacionados con la determinación de estructuras (secundarias, terciarias y asociaciones) a partir de algoritmos que toman como base la estructura primaria y la información derivada de las determinaciones espectroscópicas (NMR, dicroísmo circular UV-lejano, transformada de Fourier del espectro infrarrojo, etc.). Respecto a los algoritmos que se utilizan y la creación de nuevos, los éxitos de su aplicación son variables a juzgar por los estudios posteriores (Ginalski *et al.*, 2005; Helles, 2008) y probablemente están sujetos a una selección natural de su eficiencia.

En lo que respecta a las caseínas, entre los trabajos sobre la estructura secundaria que responden a la concordancia entre las

principales características bioquímicas antes mencionadas citaremos los de Kumosinski *et al.* (1991; 1993a; 1993b). A estos trabajos se han sumado decenas de otros que toman como válidas las hipótesis de estructuras propuestas y sostienen la explicación de otros tipos de relaciones moleculares de las caseínas (Curley *et al.*, 1998; Caessens *et al.*, 1999; Farrell *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 2005; Chakraborty y Basak, 2008). Para comenzar, hay que mencionar que es reconocida la naturaleza no-globular no-fibrosa de las caseínas, denominada a veces glóbulo fundido.

Kuosinski *et al.* (1993a) atribuyen a la  $\kappa$ -caseína bovina varias características entre las cuales se distinguen: a) la existencia de dos láminas  $\beta$  antiparalelas en la principal región hidrofóbica de la molécula, el sector aminoterminal; b) la existencia de una fuerte asociación entre la alta cantidad de giros y la cantidad de prolina; c) la muy probable posición de los giros en la superficie de la molécula; d) la ubicación de estos giros en el extremo de láminas  $\beta$  de característica fundamentalmente hidrofóbica; e) la relación entre estas láminas  $\beta$  y la auto asociación de la  $\kappa$ -caseína, como así también con las regiones hidrofóbicas de las otras caseínas que se encuentran hacia el interior de la micela; f) la posible formación de motivos que serían propios de las caseínas consistentes en estos giros hidrofóbicos basados en prolina. Vista desde un ángulo adecuado la molécula semejaría un caballo y su jinete, siendo el caballo (a grandes rasgos) la porción hidrofóbica, y las dos láminas  $\beta$  las patas del caballo, de la misma manera el jinete correspondería a la porción carboxiterminal, hidrofílica. El sector que incluye la unión peptídica susceptible a la quimosina (Phe<sub>105</sub>-Mte<sub>106</sub>) se encontraría muy probablemente en una zona de  $\alpha$ -hélice que tiene el mínimo de aminoácidos necesarios para que ésta sea estable, la hidrólisis por la quimosina desestabilizaría la hélice contribuyendo a la separación del sector del glicomacropéptido.

Según los autores mencionados (Kumosinski *et al.*, 1993b), la  $\beta$ -caseína bovina, a diferencia de  $\kappa$ -caseína, tiene un sector hidrofóbico carboxilo-terminal, siendo hidrofílico el amino-terminal. Esta proteína tiene un peso molecular de 23980 y tiene cinco péptidos (serinas) fosforilados. La molécula tiene una clara distribución asimétrica hidrofóbica-hidrofílica. Tiene un alto contenido de prolina las que están distribuidas en la molécula en forma no ordenada, pero más abundante en la región hidrofóbica carboxilo terminal. Asimismo esta parte hidrofóbica tiene un giro

mayor que permitiría el paso de agua en la molécula. Ello constituye parte de una característica general que consiste en una molécula poco empaquetada.

Según estos autores (Kumosinski *et al.*, 1991), en la estructura de la  $\alpha_{s1}$ -caseína bovina (MW = 23619) pueden distinguirse, por lo menos, cinco regiones. Empezando desde el extremo amino terminal hay un segmento (I) corto hidrofílico; luego una lámina  $\beta$  de características predominantemente hidrofóbica (II); a continuación, una región (III) donde se encuentran ocho péptidos fosforilados. Este sector contiene doce grupos carboxílicos ácidos, una porción corta tipo  $\alpha$ -hélice que conecta con los sectores siguientes. En los sectores II y III existen dos sitios susceptibles al ataque por quimosina. Los sectores IV y V son claramente hidrofóbicos y con hebras  $\beta$  extendidas, presentan tres sitios de enlaces en que puede atacar la quimosina, pero por su ubicación están menos expuestos que los otros. Los residuos comprendido entre 100 hasta 199 son claramente hidrofóbicos y serían los responsables de la auto-asociación espontánea que presenta esta caseína, como así también de la afinidad y vínculo a las otras caseínas en las micelas. La región carboxilo terminal presenta hebras  $\beta$  extendidas que se asociarían con láminas  $\beta$  de la  $\kappa$ -caseína.

Este y otros trabajos en los cuales se acentúa la necesidad de profundizar la información sobre las estructuras secundarias conocidas no son incompatibles con un nuevo enfoque que privilegia los aspectos relacionados con la falta de una estructura fija y determinada para estas proteínas. En este sentido, son particularmente interesantes los trabajos sobre el tema que consideran como constitutivo y eficiente para su función la *falta (ausencia) de un orden total* en la constitución de la estructura secundaria y terciaria de algunas moléculas proteicas. Tales proteínas ya han sido reconocidas como proteínas (o péptidos) intrínsecamente no estructuradas (IUPs) o proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) (Fuxreiter *et al.*, 2007). Las regiones desordenadas de estas proteínas pueden contener cortos *motivos lineales* de reconocimiento que pueden unirse a otros péptidos que específicamente los reconozcan y a partir de esta unión pueden producir el plegamiento (o sea el ordenamiento) del sector desordenado de la molécula. Es decir, se trata de un proceso de plegamiento asociado a la unión con el ligante. Ello ocurre con numerosas moléculas de las vías de señalización intracelular. Para dar un ejemplo dramático de la función de este tipo de proteína puede ci-

tarse el caso de la proteína p53, reconocida como supresora tumoral. Esta proteína tiene las características de: falta de rigidez, capacidad de asociación con varias proteínas que conjuntamente constituyen factores de transcripción de unión al ADN y de ser inactivada en su función por mutaciones que afecten su secuencia (Bell *et al.*, 2002, citado por Prosinecki *et al.*, 2007). Ello incluye a las mutaciones que conviertan a la proteína en más ordenada. Este es un ejemplo de una proteína no plegada, no ordenada, que exhibe la exigencia de conservar este estado para ser funcional. Con un adecuado enfoque funcional, Prosinecki *et al.* (2007) distinguen entre las proteínas que permanecen desordenadas en estado fisiológico y aquellas que luego de la unión a sus ligandos llevan a cabo un cambio conformacional que las torna más ordenadas.

La existencia de proteínas desordenadas, y parcialmente desordenadas ha llevado a la construcción de herramientas destinadas a descubrir y distinguir los desordenes estructurales en las moléculas proteicas (Csizsmók *et al.*, 2007) puesto que las predicciones sobre su existencia en el genoma humano sugieren que probablemente alcancen un millar. Asimismo se ha propuesto un nuevo tipo de asociación entre proteínas que involucra a la unión de proteínas a través de regiones no ordenadas (Tompa *et al.*, 2009). Estas asociaciones (funcionalmente *bindings*) se pueden llevar a cabo de dos maneras, las cuales (basándonos en lo ya mencionado) pueden consistir en: a) uniones en las que a medida que se lleva a cabo el reconocimiento y el acoplamiento, se genera un cambio de conformación tal que el sector se torna ordenado, o sea que se lleva a cabo una transición de estado desordenado a estado ordenado; o b) aquellas en las que el estado de desorden persiste después del reconocimiento y unión. Tompa *et al.* (2009) citan más de una docena de ejemplos de dominios desordenados en otras tantas proteínas que tienen funciones de reconocimiento. Uno de los aspectos más importantes en este campo es el hecho que los sectores homólogos con funciones de reconocimiento/señalización tienen la característica de poseer un gran número de secuencias con un altísimo grado de similitud, es decir de ser evolutivamente muy conservativos, a pesar de la falta de ordenamiento de las regiones. Estos aspectos son importantes para comprender algunos de los problemas que se presentan en la interpretación de las micelas de caseínas, según veremos más adelante.



## La evolución de la lactación

---

La información que se desprende de las investigaciones y de las opiniones de Fedorov *et al.* (1998), Oftedal (2002a; 2002b), Peaker (2002), Kawasaki y Weiss (2003), Kawasaki *et al.* (2004), y Neville (2005), llevan a elaborar un cuadro que nos parece bastante lógico sobre la forma en que se habría desarrollado la evolución de las caseínas sensible a la precipitación por calcio, y en consecuencia, de la evolución de las micelas, salvo algunos pocos aspectos puntuales que no seguimos, pero se aclaran en lo que continúa. Todo el cuadro es inseparable del proceso evolutivo de la aparición de los mamíferos y de la lactación.

Las líneas filéticas definidas que llevaron a la consolidación del mecanismo de la lactación en las distintas formas en que se presentan en la actualidad en los Euterios se esbozaron hace más de 300 millones de años, durante el final del Pérmico cuando se generaron, a partir de un antecesor común, dos grupos, Sauropsidos y Sinápsidos. Ambos compartían la novedosa estructura del huevo amniota, y llegaron a constituir los grupos más complejos, por sus estructuras y funciones, en la evolución de los Vertebrados.

El huevo amniota fue un avance significativo y con una enorme potencialidad, en la evolución. A diferencia de las otras formas de cigoto desarrollado, éste poseía, conjuntamente, membranas extraembrionales y capas externas adicionales, para el intercambio gaseoso, para el manejo de nutrientes que tiene almacenados, para el depósito de desechos, y para la retención de agua. Entre otras ventajas, ello significaba la independencia de la postura de los huevos con respecto al agua.

A partir del “grupo amniota”, por una parte, se diferenciaron los Sauropsidos, que incluían a los diápsidos (cocodrilos, dinosaurios, aves y escamosos), a las tortugas y sus antecesores, y a

otros grupos extintos (Protothyridae y Captorhinidae). Por otra parte, se originaron los Sinápsidos que radiaron en media docena de grupos definidos a nivel de Familia. Debido a la ausencia de huevos fósiles en estos grupos, desde fines del Carbonífero hasta el Triásico Inferior, se supone que los huevos que ponían y que, de diversas maneras incubaban, tenían una cáscara apergaminada, no calcárea. Para no incurrir en un error de falso negativo, es necesario señalar que, si bien la mencionada falta de hallazgos de huevos con cubierta calcárea puede estar indicando una generalizada ausencia, no se puede descartar que algunos grupos menores pudieron haber poseído huevos con este tipo de cubierta, los cuales hasta ahora no han sido descubiertos. Es interesante que se han encontrado huevos con una muy delgada cubierta calcárea, lo que está indicando que la susceptibilidad a la ruptura no era un problema limitante.

Uno de estos grupos dió origen a los Terápsidos, dentro de los cuales se generaron los Cinodontes que vivieron desde fines del Pérmico hasta mediados del Triásico. Estos también habrían tenido huevos apergaminados (pergaminoideos). Fueron los Cinodontes los que constituyeron el grupo que más innovaciones presentaron como dote de características que luego serían constitutivas de los mamíferos.

Esta larga existencia de cuarenta millones de años de las distintas y sucesivas especies que conformaron el grupo de los Cinodontes permitió la generación de caracteres novedosos y especiales, parte de los cuales podemos solamente inferir, los que fueron la base del desarrollo de los mamaliformes.

Las características que revelarían las tendencias evolutivas mencionadas (de las cuales algunas pueden ser probadas y otras surgen por evidencias indirectas) habrían sido:

- a) la incubación de los huevos (aumento de la temperatura en varios grados);
- b) la bolsa marsupiode, la cual apareció varias veces en las líneas que condujeron a los mamíferos; esta característica está relacionada con gran frecuencia con la siguiente;
- c) la presencia de huesos epipúbicos que han sido encontrados en varias especies fósiles que pertenecen a grupos relacionados con las vías evolutivas que conducen a los mamíferos;
- d) las secreciones de la piel para humedecer y proteger los huevos, lo cual ya debe haberse presentado en los predecesores Terápsidos.

En lo que se refiere a caracteres morfológicos que aparecieron desde los Sinápsidos, pasando por los Terápsidos hasta los Malmaliformes (antiguamente denominados “reptiles mamíferoides”), se encuentran:

a) la adquisición de las cámaras nasales anteriores con los maxiloturbinales,

b) las funciones asociadas a estas formaciones nasales dado que permiten conservar agua y probablemente contribuir a la regulación de la temperatura, y ya eran conspicuas en los Cino-dontes; esta regulación, para ser más precisos, se lleva a cabo en algunos mamíferos modernos en casos de hipertermia mediante el enfriamiento de la sangre que se dirige al cerebro;

c) la aparición de huesos bien vascularizados, los cuales tienen crecimiento continuo, no estacional, y se observan en los Dicinodontes, Terocefálidos y Cinodontes;

d) la aparición de un paladar secundario, que se muestra en los Dicinodontes, los terocefálidos y los Cinodontes; este rasgo indica que contaban con un metabolismo energético más alto al permitir un intercambio gaseoso continuo, y de allí la posibilidad de mantener una cierta homeotermia, lo cual implicaría la capacidad de regular la temperatura, por lo menos dentro de ciertos límites;

e) la reducción de las costillas lumbares, que se observa en los Cinodontes, lo cual está asociado a la presencia de un diafragma entre la cavidad pulmonar y abdominal e indica una mecánica respiratoria más eficiente que permite la endotermia y muy probablemente la homeotermia;

f) cambios en la pelvis y los miembros, que permiten que la forma del paso en la locomoción se base en movimientos de las extremidades en el sentido adelante/atrás, estando el arco de giro en situación vertical, y no en situación horizontal donde el movimiento circular se realiza al costado, como es el caso de los anfibios y reptiles actuales;

g) hay que mencionar que los Cinodontes mostraron reestructuración de huesos mandibulares, lo cual mejoraba la capacidad de la masticación, atributo que debe haber incrementado enormemente el abanico de presas posibles y un posible procesamiento más eficiente del alimento ingerido.

Es necesario enfatizar que el listado de características que se presenta tiene valor en la medida que, como conjunto, indican la posibilidad cierta de acceder a una condición biológica avan-

zada que sustente y exija una forma distinta de alimentación neonatal. Sin embargo cabe mencionar que otros grupos de Vertebrados amniotas también lograron algunas de estas características aisladamente, por ejemplo, numerosos géneros de dinosaurios han poseído huesos vascularizados, de crecimiento continuo, como así también algunos de ellos desarrollaron cambios en las pelvis y el fémur tales que les permitían el movimiento de giro en un plano vertical para la locomoción.

Cabe indicar que una circunstancia fortuita, probablemente astronómica, provocó al final del Pérmico, una extinción en masa que acabó con la mayor parte de los Terápsidos salvo algunos Cinodontes que se diversificaron luego al final del Triásico. Los descendientes de estos Cinodontes originaron el grupo de los Mamaliformes, sobre los cuales existe general consenso que deben haber tenido características que, por una parte, no solamente eran compatibles con, sino hasta necesarias para el desarrollo de la lactación, en esa etapa de la evolución.

Por el tipo de dentadura se puede sostener que eran insectívoros. El tamaño de los restos fósiles revelan que las distintas especies pesaban entre unos tres gramos, hasta unos 300 gramos las grandes, y unas pocas especies alcanzaban un peso mayor. Seguramente eran ágiles y podían trepar por los árboles. Asimismo se puede afirmar que eran endotermos y que, muy probablemente, tenían un metabolismo energético similar a la de los Insectívoros actuales. Los aspectos comparativos hacen suponer que eran animales nocturnos y tenían el cuerpo cubierto de una densa pelambre (Oftedal, 2002). Se ha demostrado que poseían huesos epipúbicos, los cuales ya estaban presentes en los Cinodontes avanzados. Este detalle hace presumir que tenían una bolsa marsupiode que permitía el transporte y protección de las crías.

Existe otro detalle, que no es menor, que coincide con el cuadro expuesto sobre el origen de la lactación y de los mamíferos. Corresponde a los cambios estructurales vinculados al huevo y su gestación durante estos períodos. Tales cambios deben haber acaecido concomitantemente con los genéticos. Según Brawand *et al.* (2008), los genes que regían la expresión de las vitelogeninas (VTGs) propias de la yema de los huevos propios de los antecesores de los mamaliformes deben haber ido desapareciendo del genoma de los descendientes de estos grupos más primitivos. Estos autores consideran que este es un proceso que se inició hace 200 millones de años y que concluyó hace 50 a 75 millones

de años. Los estudios de la presencia de los tres genes de VTG posibles demostraron que solamente queda uno que se expresa en los prototerios. En los marsupiales y euterios placentados actuales solamente quedan restos de exones e intrones o de pseudogenes que revelan su origen pero que no son activos. El pseudogen presente en los marsupiales demostraría una desaparición más reciente.

Dada la existencia de distintas concepciones sobre el alcance de la definición paleontológica del taxón Mammalia, es conveniente en este punto hacer una breve digresión. Kemp (2005) ha propuesto una definición clara y práctica que contempla todos los caracteres de los sucesivos grupos relacionados con la evolución de los mamíferos, privilegiando algunos caracteres a los fines de delimitar el grupo. En este sentido considera que deben denominarse *mamíferos* a los sinápsidos que poseen una articulación mandibular dentario-escamosal y que llevan a cabo una oclusión entre los molares inferiores y superiores con un componente transversal al movimiento. De esta manera conformarían un clado en el que estarían incluidos el antecesor común de *Sinonodon*, los mamíferos vivientes y todos sus descendientes. Los animales pertenecientes a este género vivieron hace 205 millones de años en el Triásico.

Todos los caracteres antes mencionados, y los propios de las especies mamaliformes que se generaron a partir de ellos, autorizan a pensar que lactaban y que esta secreción láctea poseía propiedades nutritivas y antimicrobianas. En este sentido es altamente probable que la leche contuviera lactosa, pero no glucosa. Este disacárido tendría la doble finalidad de proporcionar energía y de regular la osmolaridad de la secreción en los conductos galactóforos. En lo que se refiere a los mecanismos de defensa inespecíficos, la secreción láctea de los mamaliformes debe haber poseído oligosacáridos antimicrobianos en gran cantidad, así también lisozima y, muy probablemente lactoperoxidasa.

La lactoperoxidasa por su parte, es una variante paráloga de la mieloperoxidasa, y de la peroxidasa de los eosinófilos. La lactoperoxidasa tiene una masa molecular de unos 70 kDa; la de origen bovino está glicosilada en un 10%. De acuerdo a los estudios sobre la filogenia de estas enzimas, la lactoperoxidasa sería más antigua que la mieloperoxidasa y la peroxidasa de los eosinófilos (Loughran *et al.*, 2008). Ello es compatible con la presencia de la lactoperoxidasa en aquellas secreciones de los Vertebrata

dos que son más antiguas que la secreción láctea. Las tres están relacionadas con la tiroperoxidasa y la peroxidasa de la glándula tiroidea. Todas ellas son hemoproteínas y la estructura de sus genes guardan una gran similitud, lo que hace pensar que tienen un antecesor común (O'Brien, 2000). Estos genes se encuentran en la especie humana en sitios cercanos en el cromosoma 17.

En cuanto a la función enzimática, la lactoperoxidasa necesita de un par de moléculas que deben estar presentes para producir sus efectos: el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el ión tiocianato ( $SCN^-$ ). El agua oxigenada puede generarse en la secreción láctea, ya sea a partir de los leucocitos presentes o, en muchos casos, producida por el metabolismo de la misma bacteria que sería su víctima. El ión tiocianato es un compuesto de la leche presente en concentraciones variables, pero que no guarda necesariamente correlación cuantitativa con la actividad de lactoperoxidasa (Saad de Schoos *et al.*, 1999). Este compuesto se lo encuentra en la leche cuando ésta contiene lactoperoxidasa. En presencia de peróxido de hidrógeno, la enzima se "oxida". Éste es un estado que la proteína puede transferirlo al tiocianato, el cual se oxida a hipotiocianito. La molécula de hipotiocianito es altamente reactiva y puede a su vez oxidar fácilmente a algunos componentes de la membrana bacteriana, produciendo su anulación funcional. La lactoperoxidasa se encuentra en la secreción láctea de la mayoría de las especies conocidas.

La lisozima, a la cual ya nos hemos referido en la parte de proteínas del lactosuero, es una enzima muy ubicua: es significativo que se la encuentra en todos los animales donde se la ha buscado; tiene efectos bacteriolíticos y bacteriostáticos, de manera que su presencia es un hecho seguro en una secreción destinada a mantener un espacio libre de bacterias en estos animales durante la evolución de la lactación. Por lo tanto, es lógico suponer que debe haber formado parte de los componentes de la secreción láctea desde los primeros tiempos de su evolución.

Los oligosacáridos actuales de la leche tienen variadas estructuras, la mayor parte de los cuales guarda relación con los marcadores presentes en las membranas epiteliales que corresponden, en el epitelio intestinal, a receptores con distintas funciones. Como una consecuencia no querida, estos receptores pueden servir para el anclaje de bacterias potencialmente patógenas. A partir de ello, se explica que en forma absolutamente generalizada, en todos los mamíferos se cumple la presencia de oligosacáridos

de la leche que bloquean los sitios bacterianos que pueden servir para penetrar el epitelio gastroentérico. De esta manera, el contar con una colección de moléculas capaces de unirse a sitios específicos de las bacterias, se proporciona una manera eficiente de bloquear la invasión microbiana.

## ORIGEN DE LA GLÁNDULA MAMARIA

Según Oftedal (2002a), quien apoya sus opiniones en una interesante bibliografía con que acompaña su revisión, es muy probable que las glándulas mamarias constituyan estructuras derivadas de glándulas apócrinas. Sobre este tema existen por lo menos dos opiniones dominantes, habiendo recibido la hipótesis alternativa —el origen de las glándulas mamarias a partir de las glándulas sudoríparas— un extendido apoyo por parte de científicos que opinaron sobre la cuestión. El origen apócrino de las glándulas mamarias es sustentable por varias razones basadas en las similitudes existentes entre ellas:

- a) las glándulas de las especies antecesoras habrían estado asociadas a los folículos pilosos como lo están actualmente las glándulas mamarias de los marsupiales y los monotremas;
- b) ambos tipos de glándulas tienen epitelio simple;
- c) tanto las glándulas mamarias como las glándulas apócrinas poseen células mioepiteliales, o sea que pueden vaciar su contenido sincronizadamente,
- d) la secreción láctea tiene componentes apócrinos y de exocitosis;
- e) la maduración de la actividad secretoria está asociada con cambios endócrinos que se llevan a cabo durante el desarrollo del individuo;
- f) el volumen celular secretorio sufre poco incremento durante el período de actividad.

## EVOLUCIÓN DE LAS CASEÍNAS

Actualmente se tiene información sobre la estructura de los genes y de las proteínas presentes en la secreción láctea de un grupo reducido de especies. Afortunadamente los estudios siempre son dirigidos, y para el caso los principales objetivos siem-

pre han estado centrados en proteínas que representan la parte más importante de las funciones de la lactación. En ellas se destacan: a) las que por su estructura y abundancia explican su papel en la nutrición, como es el caso de las caseínas, b) las que por su especificidad sirven a las funciones de defensa o de homeostasis como son las inmunoglobulinas y las enzimas antibacterianas, y c) las que por su expresión absolutamente restringida a la glándula mamaria aseguran su absoluta dependencia de los mecanismos moleculares vinculados a los genes que intervienen en tiempo y forma en la función de lactación.

Los estudios de la secuencia de nucleótidos de los RNAm de caseínas de rata, ratón, cobayo y vaca, han revelado cierta divergencia específica entre las secuencias de nucleótidos. Este análisis ha sido afinado cuando se completaron las secuencias completas de los genes, lo cual comprendía, además del sector codificante, lo relacionado con los intrones y otros sectores no traducidos en la proteína madura. Esta divergencia no es extraña ya que las caseínas representan una de las familias de proteínas en las cuales la evolución molecular, representada por la tasa de sustitución de aminoácidos por unidad de tiempo, es una de las más rápidas que se ha estudiado (Rosen, 1987). Sin embargo actualmente, a partir de la información existente y de los nuevos criterios que se han generado basados en esta información, existen herramientas y razones más amplias para establecer las homología y las similitudes que expliquen los orígenes filogenéticos de las actuales proteínas.

Volviendo al sector traducido de los genes debemos mencionar algunos hechos (para el caso estructuras, algunas de ellas en sectores no traducidos) que compensan la mayor variabilidad encontrada en algunos sectores de las secuencias mencionadas. Estas estructuras conservadas son: a) regiones de RNAm de las caseínas sensibles al calcio ( $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína y  $\beta$ -caseína) que son altamente similares y que involucran a las secuencias correspondientes a las zonas de la molécula donde se lleva a cabo la fosforilación, b) las estructuras de los exones e intrones, especialmente la zona limítrofe entre éstos que tiene características especiales que muestra un origen común para, por ejemplo, las caseínas calcio-sensibles, c) la región no codificante 5, y d) las secuencias de las zonas del péptido señal las cuales son muy conservadas en todos estos genes. Es destacable que todas ellas son biológicamente importantes, incluida la conservación de los

sitios de fosforilación que es de crítica importancia para su función en el transporte y unión al fosfato cálcico de la leche. Por otra parte, la única caseína no sensible al calcio, la  $\kappa$ -caseína, muestra en su secuencia que el lugar donde actúa la quimosina ( $F_{105} M_{106}$ ), es altamente conservado en casi todas las especies estudiadas.

El conocimiento de las secuencias de las distintas partes de los genes de las caseínas (los exones, incluyendo las regiones no traducibles, las correspondientes al péptido señal y los intrones) es ineludible por motivos que tienen que ver con la relación que guarda su origen filogenético con el correspondiente de otras proteínas. Respecto a este punto cabe adelantar que las tres caseínas calcio-sensibles tienen orígenes comunes, a lo cual vamos a referirnos en esta sección. Respecto al origen de la  $\kappa$ -caseína, si bien hay argumentos en el sentido que pudiera estar relacionada con las otras tres, el problema todavía parece estar abierto.

#### ORIGEN DE LAS CASEÍNAS CALCIO-SENSIBLES

Entre las hipótesis sobre el origen de las caseínas calcio-sensibles se encuentra la que sostenía que aquellas pudieran haberse originado a partir de un gen ancestral correspondiente a una chaperona o a una proteína de shock térmico. La idea parecía haber encontrado un cierto grado de consolidación a partir de los resultados de trabajos de Bhattacharyya y Das (1999) sobre algunas propiedades de la  $\alpha_{S1}$ -caseína. En base a ensayos experimentales, los mencionados autores sostenían que estas proteínas tienen la capacidad de actuar como chaperonas. Asimismo, en cuanto al origen, se argumentaba alrededor de una secuencia de etapas, las cuales por sí mismas deben ser consideradas como muy probables. El desarrollo se concebía como un proceso en el que una duplicación de un gen inicial (una chaperona original) y la ocurrencia de que una posterior diferenciación en una de las copias del gen original habría permitido que el gen se activara específicamente en las células epiteliales de la glándula mamaria. Ello habría abierto la posibilidad de que la(s) proteína(s) (una protocaseína) se sintetizara(n) en grandes cantidades y se exportara(n) por las secreciones de la (proto) glándula mamaria. Las duplicaciones y cambios posteriores en los genes habrían llevado a la generación

de los distintos tipos de caseína ( $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  y  $\beta$ ). En cuanto al tiempo de su aparición, el primer paso en este camino se habría producido en la base del origen de los mamíferos, con la aparición del gen primitivo. Luego se habrían producido duplicaciones intragénicas y se habrían originado, antes de la radiación de los mamíferos, los miembros individuales de las familias de genes de las otras caseínas (Rosen, 1987). Es adecuado reconocer que la capacidad tipo chaperona de la  $\beta$ -caseína tiene respaldo en ensayos experimentales (Zhang, *et al.*, 2005).

No obstante lo expuesto, debemos mencionar que debido a la distribución actual de los genes comprometidos en la síntesis de caseínas, de los numerosos genes filogenéticamente relacionados, y a otras razones que expondremos, las micelas de caseínas habrían aparecido mucho antes del Cretácico. Conviene mencionar que el detalle temporal no afecta en sí la teoría sobre los genes originales, puesto que el mismo mecanismo génico podría haber ocurrido antes.

Sin embargo, la hipótesis del origen a partir de una chaperona posía aspectos no resueltos, tales como, a) el relacionado con la falta de explicación sobre la naturaleza hidrofóbica de las caseínas actuales, y b) el mecanismo para mantenerlas en suspensión, lo cual actualmente está a cargo de la  $\kappa$ -caseína. Estas discordancias impedían cerrar el problema.

Evitar la precipitación de las caseínas es una necesidad en todo el trayecto de la leche, desde el alvéolo y los conductillos de la glándula mamaria hasta llegar al estómago de la cría. Hay que considerar que la lactancia implica el paso de la leche durante un tiempo variable de segundos, y seguramente minutos en aquellas especies, a través de un ambiente de temperatura relativamente baja, como lo es la boca de la cría. Asimismo estas necesidades fisiológicas quizás hayan sido más imperiosas en los mamíferos primitivos en los cuales la secreción a nivel de la piel no estaba organizada como en los mamíferos modernos, sino más probablemente como en los monotremas, donde la cría lame la secreción de la madre. Si en el tiempo y nivel evolutivo estas proteínas tenían características de una chaperona probablemente hubiera sido muy conveniente. Pero para el caso, ello es más que improbable si se tienen en cuenta los datos que actualmente se manejan sobre las estructuras correspondientes y se hace una lectura retrospectiva de la evolución génica supuestamente recorrida. Más bien este papel le habría correspondido a la  $\kappa$ -caseí-

na, la cual actualmente lleva a cabo una función de protección análoga, con la cual evita la precipitación de las otras caseínas.

Actualmente se conocen algunos hechos que permiten otra hipótesis. Uno de los primeros aspectos a considerar consiste en que los genes de todos los tipos y subtipos de las caseínas se encuentren en una misma región de un solo cromosoma conjuntamente con la mayoría de los genes que codifican para proteínas portadoras de calcio en todos los mamíferos estudiados. En segundo lugar, hay que mencionar que, por razones estructurales de los genes y de las proteínas, en las especies estudiadas hasta ahora, se hace evidente que todas las proteínas fosforiladas portadoras de calcio secretoras (SCPP) pertenecen a una amplia misma familia (Kawasaki *et al.*, 2004).

Las proteínas que integran esta familia son:

a) Las proteínas de la matriz de enamel que dirigen la cristalización extracelular de la hidroxiapatita: tales son la amelogenina, la ameloblastina y la enamulina.

b) La caseínas, sean calcio-sensibles o no,  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína.

c) Las proteínas salivales que pertenecen estructuralmente a la familia génica de SCPP, la estaterina, la histatina 1, y la histatina 2.

También están relacionadas con estas proteínas las siguientes, que forman parte de la matriz de los huesos y de los dientes: la sialoproteína de la dentina, la fosfoproteína ácida de la matriz de la dentina, la sialoproteína de unión a la integrina, la fosfoglicoproteína de la matriz extracelular y la osteopontina, las cuales parecen pertenecer a un cluster más alejado (Kawasaki y Weiss, 2003). La información actual hace pensar que los primeros animales que han poseído proteínas de la matriz de enamel son los Conodontes (Smith y Coates, 2001, citado por Kawasaki *et al.*, 2004).

Los tres primeros grupos anteriormente mencionados parecen haberse originado en una proteína secretoria mineralizante, la osteonectina, (Kawasaki *et al.*, 2004) que se encuentra, en diversas formas, tanto en Invertebrados como en Vertebrados. Esta proteína constituye una estructura rica en cisteína, es ácida y secretoria (SPARC).

Uno de los argumentos más fuertes en que se respalda la hipótesis del origen común de las caseínas y las otras proteínas indicadas descansa en la estructura de los intrones, los cuales

son todos de fase 0 (cero). Ello significa que sus límites no interrumpen los codones de los exones, todo lo cual es un fuerte argumento a favor de, a) la forma en que se originaron los exones, y b) la relación entre los genes actuales que conservan la estructura. Varios trabajos han remarcado la importancia de estas estructuras en la evolución y la filogenia (Fedorov *et al.*, 1998; Fedorov *et al.*, 2001; Fedorov *et al.*, 2002).

Debemos mencionar que los genes activos de las proteínas mencionadas se encuentran en la especie humana en el cromosoma 4, sector q13.3 (*Cytogenetic band* según *Ensembl*. GeneCards: Genes *CSN3*, *CSN2*, *CSN1S1*). En el mismo cromosoma 4 y sector q13.3, se encuentran dos genes silenciosos correspondientes a los genes ortólogos en otras especies de las  $\alpha_{S2}$ -caseínas. Como sabemos estos no se traducen en proteínas en nuestra especie, pero los hemos heredado y se encuentran en los cromosomas.

Cabe agregar que de la  $\alpha_{S2}$ Cn derivaron las proteínas estaterina y la histatina, las cuales se encuentran en la saliva. En los ratones la estaterina se encuentra como pseudogen. En cuanto a la histatina, esta proteína ha perdido la parte de la secuencia que contiene los fosfatos que unen el calcio (Amerongen y Veerman, 2002, citado por Kawasaki y Weiss, 2003).

En la siguiente lista, hemos resumido la información sobre las proteínas mencionadas y el cromosoma humano en que se encuentran.

#### Fosfoproteínas secretoras calcio portadoras – SCPP

##### 1) Proteínas de matriz Enamel:

- Amelogenina (AMEL) Cr.X Y
- Ameloblastina (AMBN) Cr. 4q13
- Enamelina (ENAM) Cr. 4q13

##### 2) Caseínas:

- $\alpha_{S1}$ Cn Cr. 4q13.3
- $\alpha_{S2}$ Cn L1 Cr. 4q13.3 pseudogen
- $\alpha_{S2}$ Cn L2 Cr. 4q13.3 pseudogen
- $\beta$  Cn Cr. 4q13.3
- $\kappa$ -Cn Cr. 4q13.3

- 3) Proteínas salivales:
  - Estatherina – (STATH) Cr. 4q13.3
  - Histatina 1 – (HTN1) Cr. 4q13.3
  - Histatina 2 – (HTN2) Cr. 4q13.3
  
- 4) Proteínas de la matriz ósea y relacionadas:
  - Proteínas de la matriz extracelular (ECM-P)
  - Fosfoproteína extracelular de unión al calcio (SCPP)
  - Proteína secretoria rica en cisteína (osteonectina) (SPARC)
  - Proteína secretoria rica en cisteína (simil)-1 (SPARCL-1)
  - Osteopontina (SPP1)

Como se ha dicho anteriormente es probable que los componentes de la leche hayan surgido como principios activos de la secreción cutánea para proteger los huevos pergaminoideos del ataque de los microorganismos. Es casi seguro que las propiedades nutricionales se agregaran inmediatamente después por el hecho que para proporcionar este tipo de componentes primero había que contar con un ambiente que estuviera protegido de la proliferación bacteriana.

El panorama que ahora se maneja autoriza a señalar que todo ello seguramente debe haber ocurrido mucho antes de la aparición de los monotremas, a diferencia de lo que se había creído razonable suponer hasta hace un par de décadas. En este sentido la edad de la lactación ha retrocedido casi doscientos millones de años en la concepción actual.

Hay que mencionar que los marsupiales tienen dos caseínas calcio-sensibles:  $\alpha$  y  $\beta$ . La  $\alpha$ -caseína se parece a la  $\alpha$ -Cn de los euterios, mientras que su  $\beta$ -caseína no parece homóloga a las caseínas beta de los placentarios, sino que es propia de los marsupiales. Este es un hecho interesante puesto que mostraría que en lo que respecta a la lactación, las divergencias entre los placentarios y los marsupiales son mayores a lo supuesto y confirma que los mecanismos que dieron lugar a esta función son más elásticos de que se había supuesto en lo referido a la evolución de los sectores de las caseínas que no corresponden a las regiones conservativas. Otro aspecto que surge a partir de esta divergencia de las caseínas es que los marsupiales deben haber llevado a cabo una evolución independiente por un tiempo suficientemente largo que explicaría las diferencias con la herencia de

los euterios. Este es probablemente uno de los puntos más problemáticos.

### ORIGEN DE LA $\kappa$ -CASEÍNA

Una forma de acceso al problema consiste en suponer que los genes primitivos originales de las caseínas se encontraban en los mamaliformes. Si bien esta suposición es lógica, y seguramente cierta, es incompleta a la luz de los conocimientos actuales. Existen dos problemas que hasta ahora no sabemos si corresponden a dos situaciones diferentes: el origen de las caseínas calcio-sensible, que parece estar resuelto, y el origen de la  $\kappa$ -caseína.

La existencia de homología en la secuencia aminoacídica de la  $\kappa$ -caseína y de la cadena de  $\gamma$ -fibrinógeno había llevado a sugerir que la  $\kappa$ -caseína y el  $\gamma$ -fibrinógeno podrían estar vinculadas filogenéticamente. Hay razones para suponer que el fibrinógeno está presente en todos los Vertebrados desde hace 450 millones de años. Como la  $\kappa$ -caseína debe haber aparecido mucho tiempo después durante el advenimiento de la lactación en los Cinodontes, según nuestro conocimiento actual, parecía razonable apoyar la hipótesis que esta caseína hubiera evolucionado a partir de la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno, dada una cierta homología encontrada entre ellas (Jollès *et al.*, 1978; Rosen, 1987; Rutherford y Gill, 2000). Actualmente se considera que esta hipótesis tiene que ser revisada puesto que las regiones homólogas de los genes correspondientes tienen una estructura muy distinta: en la cadena gamma del fibrinógeno esta región está codificada por seis exones distintos, mientras que la región (supuestamente) homóloga de la  $\kappa$ -caseína está incluida en un solo exón. Además se ha comprobado que la  $\kappa$ -caseína tiene similitud con el gen de la mucina 10 (en el ratón) en la secuencia del sector UTR (no traducible), en el péptido señal y en una porción del exón 3 (Kawasaki y Weiss, 2003; Kawasaki *et al.*, 2004), lo cual convierte en más improbable la hipótesis del  $\gamma$ -fibrinógeno.

— Cuarta parte —

## Síntesis de las proteínas lácteas

---

### LA DEPENDENCIA HORMONAL

La ciencia experimental ha tenido, a lo largo de cinco siglos, un notorio éxito con la aplicación de un criterio analítico en la observación y la evaluación de las funciones que determinan los procesos físicos, químicos y biológicos. En el caso particular de la biología experimental, su nacimiento como disciplina científica puede fijarse con absoluta confianza a mediados del siglo XIX, a partir de los trabajos de Claude Bernard, quien en su libro *Introducción al estudio de la medicina experimental* (1878 en Bernard, 1959), introdujo y armonizó el cometido de la lógica, el criterio y el rigor en la investigación biológica.

Con ello, se plasmó una forma de encarar los problemas funcionales que no era nueva en sí misma porque los científicos ya habían conseguido la mayor parte de sus logros derivándolos de la capacidad de separar los factores (causales) que se encuentran en la base de todos los procesos estudiados. De esta manera, se reducían las variables a un mínimo y era posible estudiarlas aisladamente. Haciéndolo así se comprendía su naturaleza y se conocía la influencia de cada una en los procesos involucrados. Para el caso que nos ocupa se puede mencionar un par de aspectos generales referido a las dificultades con que se enfrenta la investigación científica en el manejo de la complejidad, de la comprensión que tenemos de la realidad, y de las herramientas estratégicas que se han puesto en práctica para desembrarla.

En todas las épocas, los procesos biológicos analizados han sido complejos y difíciles por la comprensión limitada y las herramientas insuficientes, debido a la situación limítrofe del objeto

estudiado. La estrategia analítica en la investigación fue lo más criterioso y eficiente que se tuvo a mano, y de allí sus logros. Una consecuencia casi lógica fue el cargo de reduccionismo reprochado por algunas corrientes de opinión de la posteridad. En las ciencias biológicas, el éxito del criterio analítico casi no había tenido excepciones en el siglo XX. Separar las variables y otorgarles un valor agregable siempre fue una regla. Los aspectos analíticos se fortalecieron y el cargo de reduccionismo fue atemperado por la aplicación de instrumentos más eficientes derivados sobre todo de las matemáticas y la estadística de los sistemas complejos.

Es interesante señalar que, para beneplácito de los anti-reduccionistas, existen numerosas funciones biológicas en las cuales, hasta hace relativamente poco, no ha sido fácil mantener un criterio a partir del cual se pudiera otorgar, a cada variable comprometida, un valor agregable y cualitativamente distinguible. Este el caso de la influencia de las hormonas clásicas de los mamíferos sobre la lactación. Si bien siempre hubo acuerdo sobre el hecho que un cierto número de hormonas tenía influencia sobre esta función y su órgano responsable, la glándula mamaria, nunca hubo demasiado consenso sobre el papel de cada una. Una de las grandes dificultades fue la incapacidad de establecer un esquema general sobre el mecanismo subyacente que abarcara todas las especies en estudio. Para colmo, las especies en estudio no llegaban a una docena, lo cual equivalía a sospechar que, si con lo poco hay problemas, con lo mucho sería caótico. Probablemente la mayor dificultad (y un menor acierto) se originaba en la búsqueda de un efecto único, directo y simple para cada una de las hormonas comprometidas.

El actual conocimiento sobre las funciones biológicas tanto de aquellas que son sistémicas, como de las diversas y heterogéneas funciones intracelulares, ha cambiado sus perspectivas y está generando nuevos campos de estudio los cuales son claramente transdisciplinarios. Ello está conduciendo a la individualización de los aspectos que dificultaban la solución de los interrogantes, los cuales se generaron en gran medida debido a la creación de esquemas generalizadores que para las épocas eran inmaduros por falta de información.

La situación está siendo superada notoriamente y los endocrinólogos moleculares pueden decir con aceptable confianza que no habrá más penas ni olvidos. Los mayores aportes sobre el tema lo

constituyen los avances que se han llevado a cabo en el conocimiento de: a) los mecanismos de señalización intracelular y la fuerte interacción existente entre las respuestas celulares a las hormonas, b) los mecanismos genéticos interactuantes al nivel de conjunto de genes intervinientes en cada proceso, c) los cambios ontogenéticos que acaecen en cada especie y que son (heterogéneamente) diferentes entre distintos grupos de mamíferos.

En el estudio del mecanismo de la lactación es pertinente no perder de vista dos hechos históricos: en primer término, que la lactación es una adquisición relativamente reciente y propia de este grupo de Vertebrados. Evolutivamente esta función general es mucho más joven que todas las hormonas y factores de crecimientos conocidos. También es, obviamente, más reciente que todas las formas de reacciones enzimáticas. Casi como una consecuencia de lo anterior, es mucho más reciente que todos los sistemas de regulación (Fernández, 2006), incluido el de la temperatura, el cual se ha desarrollado varias veces y en varios grupos zoológicos. La lactación tan solamente parece ser anterior a una función que se distingue y considera superior: la función intelectual, la cual, a criterio de numerosos estudiosos del tema coinciden en señalar que es hija de la lactación, puesto que se desarrolló con ésta y gracias a ésta.

En segundo lugar, como una consecuencia de lo señalado, en la lactación muchas de sus estructuras, y las funciones que éstas sostienen, son funciones antiguas, las cuales servían a otros menesteres y formaban parte de conjuntos de funciones que tenían objetivos distintos. Es notorio que, muchas veces, tales funciones estaban originalmente asociadas a mecanismos regulatorios y tenían el objetivo de modular procesos sistémicos. Para el caso, se puede mencionar el papel sistémico de hormonas que actualmente también están comprometidas en la lactación: las hormonas tiroideas en el metabolismo energético; la insulina en el mantenimiento de la glucemia; la hormona del crecimiento que directamente o en forma mediada por otras hormonas determina la generación, ciclos celulares y diferenciación celular en varios tipos de tejido y en distintas épocas del desarrollo; la prolactina que lleva a cabo directamente o colabora en medio centenar de funciones en todas las Clases de los Vertebrados.

Las claras discrepancias en el comportamiento de algunas hormonas en diferentes especies seguramente se deben a grandes diferencias fisiológicas entre grupos de mamíferos determinadas

por adaptaciones no compartidas. Por ejemplo, las diferencias existentes entre roedores y bóvidos en lo que respecta al metabolismo energético, seguramente tiene su correlato en las diferencias existentes en los efectos hormonales. Observaciones recientes han demostrado que estas diferencias existen, y en el listado de ellas, el diferente comportamiento de la leptina o de la insulina son solamente ejemplos. Consideramos que es pertinente señalar que el estudio de los mecanismos que determinan, modulan y regulan la función de la lactación demuestra que ellos son extremadamente complejos y la sensación de lo incompleto del conocimiento respectivo siempre rondó alrededor de este tema.

Uno de los máximos exponentes de la investigación en este campo, el Dr. R. Michael Akers, escribió en una revisión sobre la endocrinología de la lactación en 1985: *“Both mammary growth and initiation of milk synthesis are intimately dependent upon complex interaction among hypophyseal, adrenal, ovarian and placental hormones. Mechanisms in hormonal control of these processes, particularly in dairy ruminants, are understood poorly”*. Veintidós años más tarde, en una excelente actualización sobre el mismo tema (Akers, 2006), escribió en la sección de esta revisión dedicada a los factores de crecimiento (a la que denominó *Growth Factors Soup*), *“This is a time of astonishingly rapid advancements and accumulation of enormously detailed information. Unfortunately, it is also confusing as more details emerge to force reclassification or new understanding of these messengers”*. Para ubicar esta frase en su concepción de todo el tema, citamos una de las Conclusiones de la mencionada revisión: *“Despite the rich history that identified the classic mammogenesis and lactogenic hormones, their receptors, and now some of the pieces of their signaling cascades, comprehensive understanding of mammary development and function, particularly in economically important dairy animals, is in its infancy”*.

En lo que sigue se describirá parte de la información actual sobre los aspectos endócrinos de la lactación, teniendo siempre en cuenta que, en muchos casos, los detalles conocidos poseen excepciones. En primer lugar, se mencionarán y describirán sucintamente las principales hormonas que se conocen que están relacionadas con el desarrollo de la glándula mamaria. Luego se expondrá lo pertinente a la síntesis, producción y regulación de la secreción láctea.

En gran modo coincidente con lo expresado en el párrafo anterior, la lista de los factores comprometidos no es exhaustiva,

pero tampoco sería exacta y generalizada la mención de un conjunto mayor puesto que también son mayores las excepciones y variación cuando la lista se alarga. La historia de la investigación acumulada en el tema es coincidente con la importancia de cada hormona. Las principales entre éstas y que dan cuenta de los aspectos substanciales de la lactación son: la progesterona, los estrógenos, los glucocorticoides, la prolactina, el lactógeno placentario, la somatotropina, la insulina, las hormonas tiroideas y la oxitocina. Estas hormonas tienen desigual contribución en dos etapas funcionales de la lactación, cuales son:

- a) el desarrollo de la glándula mamaria (mamogénesis) y,
- b) las funciones de síntesis y producción de leche (lactogénesis y galactopoyesis).

Al listado anterior agregaremos los factores de crecimiento, las interacciones celulares y las hormonas de acción local.

## MAMOGÉNESIS

La glándula mamaria empieza a esbozarse durante el desarrollo embrionario de la hembra con una ramificación incipiente de los cordones epiteliales que formarán los conductos. Después del nacimiento se lleva a cabo un lento desarrollo determinado por los efectos de señalización producidos por las interacciones tisulares y la necesaria presencia de los estrógenos. Asimismo son imprescindibles las *hormonas metabólicas* relacionadas con la lactación: somatotropina, corticoesteroides, hormonas tiroideas e insulina (Neville *et al.*, 2002). Luego, en la pubertad, se produce el alargamiento y mayor ramificación de los conductos. Este proceso descansa sobre todo en la proliferación epitelial en los extremos de los ductos debido a una activa mitosis en estas yemas de crecimiento. Este progreso está claramente determinado por factores hormonales, como así también por la influencia de las interacciones celulares.

Las etapas siguientes necesitan para llevarse a cabo, además de las hormonas metabólicas, de la actividad de las *hormonas reproductivas* relacionadas a la lactación, los estrógenos, la progesterona, la prolactina, el lactógeno placentario y la oxitocina. Como se observa no están incluidas las hormonas adenohipofisarias luteinizante y folículoestimulante.

Durante la preñez se lleva a cabo una tercera ronda de rami-

ficación, formándose, en los extremos de los conductos, los acúmulos celulares que darán lugar inmediatamente a los alvéolos. Una etapa, variable según las especies, a la que se ha denominado de proliferación (Neville *et al.* 2002), se continúa insensiblemente con la que corresponde a la formación de los alvéolos, lo cual también está comprendido, según sean los criterios de clasificación.

## LACTOGÉNESIS

La etapa siguiente se produce en dos fases denominadas lactogénesis I y lactogénesis II (Bussmann *et al.*, 1996). Si bien estas etapas han sido descritas en los roedores, son aplicables a otras especies de mamíferos (Neville *et al.*, 2002). La lactogénesis I ocurre a la mitad de la preñez y en los roedores se corresponde con el comienzo de la síntesis de  $\beta$ -caseína y de WDNM1. El gen de esta última proteína fue descubierto a partir de investigaciones sobre la expresión del carácter no metastásico de líneas celulares de ratón. La WDNM1 ha demostrado tener un papel importante en el desarrollo (Dear *et al.*, 1988).

La última etapa (lactogénesis II) empieza al final de la gestación con la disminución de la secreción de progesterona, hecho que hace caer la inhibición ejercida por esta hormona sobre la síntesis de proteínas lácteas. Durante la lactogénesis II empiezan a sintetizarse la  $\alpha$ -lactalbúmina, y la WAP (en los animales que la expresan).

Asimismo es el momento en que se produce la clausura tisular que asegura el aislamiento de los alvéolos y canalículos respecto a los espacios intercelulares, de manera que el contenido de la secreción en los alvéolos se vuelque exclusivamente al exterior. También es el período en el que las gotas lipídicas (glóbulos grasos) empiezan a pasar desde las células secretoras a los alvéolos. Gran parte de los efectos se llevan a cabo debido a la actividad desarrollada por factores de crecimientos u otros factores extracelulares. Algunas de estas acciones en la glándula se efectivizan de manera paracrina, por ejemplo, por las proteínas Wnt que son segregadas por las células epiteliales y que actúan sobre células vecinas. Las proteínas de este grupo tienen a su cargo funciones morfogénicas y actúan como reguladoras de funciones endócrinas (Mulholland *et al.*, 2005). En las células epite-

liales la vía de señalización intracelular activada por esta proteína parece estar mediada por la  $\beta$ -catenina.

En lo que sigue expondremos los efectos o acciones de las principales hormonas en la mamogénesis y la lactogénesis. Esta forma de describir los procesos que les atañen es casi obligada para circunscribir los módulos de información, pero tiene la desventaja que se repiten fases de las secuencias de las actividades fisiológicas.

## LAS HORMONAS REGULADORAS

*Progesterona.*— Esta hormona esteroidal producida por el ovario induce el desarrollo, en forma conjunta con los estrógenos, de lóbulos y alvéolos de la glándula mamaria (Robinson, *et al.*, 2000). Los receptores de progesterona se encuentran tanto en las células epiteliales secretoras como en las células del estroma (Humphreys *et al.*, 1997). Las células de los tejidos de las yemas, brotes y conductillos en crecimiento tienen receptores para progesterona en sus membranas y su unión produce un aumento en la síntesis de DNA y de RNAm. Se sabe que los estrógenos producen un aumento en el número de receptores para progesterona en las células en crecimiento y diferenciación, lo cual constituye un buen ejemplo de un mecanismo endócrino que tiene fases en las cuales la anterior prepara y asegura la actividad de la siguiente.

Los efectos que lleva a cabo la progesterona promoviendo la ramificación de los conductos mamarios (Briskin *et al.*, 1998; Atwood *et al.*, 2000) en la fase final del desarrollo de la glándula están orquestados por la secreción de factores, para el caso las proteínas Wnt (Robinson, *et al.*, 2000) que efectivizan estas acciones en forma paracrina sobre receptores transmembranas (Fz) que a su vez activan una vía de señalización que conduciría a la estabilización de la  $\beta$ -catenina. Esta proteína se une, activándolo, a un factor de transcripción el cual produce los efectos génicos. Varios de estos efectos se producen en forma sinérgica con los impulsados por el IGF-I (Ruan *et al.*, 2005).

Los estudios de los efectos morfogénéticos han demostrado que para que éstos se lleven a cabo en forma normal el mecanismo de unión de la hormona con su receptor debe funcionar adecuadamente. En este sentido se conoce de la existencia de

por lo menos dos isoformas (A y B) del receptor de progesterona, que difieren por la longitud de la cadena proteínica. Es necesario que la isoforma B esté presente para que el proceso de morfogénesis sea adecuado y produzca la ramificación y la alveologénesis normal (Mulac-Jericevic *et al.*, 2003).

La progesterona inhibe la síntesis de caseínas y de  $\alpha$ -Lactalbúmina, lo cual tiene como consecuencia que inhibe la lactación. Desde hace más de medio siglo se sabe que la supresión de la secreción de progesterona induce el comienzo de la producción de leche. Entre los efectos inhibidores que tiene la progesterona sobre la secreción láctea, algunos parecen llevarse a cabo en formas concurrentes similares, por ejemplo, inhibe la formación de receptores de prolactina y bloquea asimismo a los receptores de glucocorticoides en la glándula mamaria, con lo cual se bloquea la síntesis de proteínas. Los receptores para progesterona solamente se expresan en las células de la glándula mamaria hasta el momento del nacimiento de la cría, luego desaparecen. Por otra parte, uno de los efectos complejos de la progesterona es la capacidad de inhibir la apoptosis actuando en forma conjunta con los glucocorticoides (Feng *et al.*, 1995). Ello se mencionará nuevamente mas adelante.

Asimismo, actualmente se sabe que la progesterona se expresa en otros tejidos. Entre estos sobresale su síntesis por las células de la glía en el sistema nervioso. Su capacidad de intervenir en la reparación de los nervios periféricos se evidencia por su papel en la estimulación del crecimiento de las neuritas, la maduración de los axones que han sido criolesionados y la remielinización de las fibras nerviosas regeneradas (Koenig *et al.*, 2000),

*Estrógenos.*— Es un hecho conocido desde hace más de medio siglo que para el desarrollo del tejido mamario se necesita de la conjunción endócrina de estrógenos, progesterona, prolactina y somatotropina, para todos los cuales existen receptores en las células de la glándula. El estrógeno más utilizado en los ensayos es el estradiol. Además es conocido que los estrógenos estimulan la liberación de factores de crecimiento por el riñón, por la hipófisis y a partir de células de la propia glándula mamaria. En este último caso, los factores mencionados actuarían localmente de forma paracrina y autocrina. La secuencia de las acciones de esta hormona a nivel tisular sería: en primer lugar, la estimulación del crecimiento del estroma y, a continuación, el correspon-

diente a las células epiteliales que formarán los conductos.

Hay diferencias entre los bóvidos y los roedores en el sentido que los efectos sobre aquellos grandes mamíferos no incluyen la estimulación del crecimiento del estroma, de manera que es probable que la progesterona estimule la secreción de factores de crecimiento por parte de estas células. Los factores de crecimiento que intervendrían en este mecanismo incluyen: Factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-I), Factor de crecimiento del hepatocito, Factor de crecimiento epidermal, Factor de crecimiento de fibroblasto, Factor de crecimiento transformante- $\alpha$ , y Factor estimulante de colonia de macrófagos. Por otra parte, se conoce que el Factor de crecimiento transformante- $\beta$  tiene efectos sobre la glándula mamaria que dependen de las dosis que se apliquen.

En el caso de los estrógenos, se ha comprobado que éstos inhiben la síntesis del receptor del Factor de crecimiento de fibroblasto 7 (FGF-7; también denominado receptor del Factor de crecimiento de queratinocitos, KGFR). La progesterona en cambio estimula la síntesis de este receptor (Imagawa y Pedchenko, 2001). Los nombres de los factores de crecimiento tienen más relación con el tejido donde fueron encontrados que con una especificidad de acción tisular. Es un hecho conocido, y los ejemplos crecen, que los factores de crecimiento tienen un espectro más o menos amplio en lo que atañe a los tejidos sobre los cuales tienen efecto.

El estradiol tiene participación en la iniciación de la lactación. Es conocido que tanto los glucocorticoides, como el estradiol incrementan su concentración en el suero sanguíneo en pocos días que preceden al nacimiento de la cría. El efecto sería en parte directo en las células mamarias y determinaría la síntesis de receptores para prolactina, pero en forma más importante, el efecto sería mediado por la inducción de la secreción de prolactina por la adenohipófisis.

Una vez instalada la lactación la administración de estrógeno puede suprimirla, mediante la anulación del reflejo secretor neuroendócrino. Conviene mencionar que los estrógenos no tienen participación en la etapa de la lactogénesis.

*Prolactina.*— La prolactina es una hormona peptídica que desarrolla numerosas funciones en los diferentes grupos de Vertebrados. Si bien es producida principalmente por la adenohipófisis, también es sintetizada por varios tejidos, lo cual ha sido

comprobado en nuestra especie. Los efectos ligeramente distintos en diferentes especies constituye un tema que amerita cautela en las extrapolaciones teóricas, como lo es también en lo referido a la utilización práctica de la información en nuestra propia especie (Ben Jonathan *et al.*, 2008).

La prolactina tiene en los mamíferos, además de las funciones asociadas a la lactación que es la más notoria, conocida y estudiada, varias otras actividades relacionadas con la reproducción (Bachelot y Binart, 2007). Entre éstas se incluyen el mantenimiento del cuerpo lúteo, que parece estar limitado a los roedores, la conducta maternal, y la fertilidad en el macho. Durante la gestación los niveles de prolactina se incrementan más de diez veces y permanecen altos durante el posparto.

En la mamogénesis tiene una acción permisiva, sin la cual la progesterona y los estrógenos no pueden inducir el crecimiento mamario. En roedores, puede estimular directamente, durante la preñez, el crecimiento lóbulo-alveolar y también puede estimular la ramificación de conductos mamarios en roedores hembras no preñadas.

La forma en que se llevan a cabo los efectos celulares de la prolactina involucran los siguientes pasos: unión de la hormona al receptor de membrana y dimerización de éste; acción de la porción intracelular del receptor sobre la quinasa Janus 2 (JAK2) de manera que ésta fosforila, activándolos, a factores de transcripción (STAT5) de la familia STAT. El receptor de prolactina estaría constitutivamente unido al JAK2. El STAT5a se transloca hacia el núcleo, y actúa sobre los elementos promotores de los genes específicos comprometidos en la respuesta lactogénica (Yang *et al.*, 2000). Es conocido que el Factor de Crecimiento Insulinóide I estimula la unión del STAT5 a los elementos promotores del DNA.

La interrelación entre la prolactina y los IGFs es compleja: en los mencionados procesos de desarrollo de la glándula mamaria parte de los efectos de la prolactina se llevan a cabo mediante la inducción de la síntesis de IGF-II por células de la glándula mamaria (Hovey *et al.*, 2003). Los efectos lactogénicos son los más conocidos y los más importantes de esta hormona. Si se bloquea la vía de activación descrita de iniciación de la lactogénesis mediante derivados del cornezuelo del centeno que inhiben la liberación de prolactina, la lactogénesis no se inicia. Asimismo, en los roedores, la prolactina es necesaria para el mantenimiento de la

lactación. Por otra parte, en los bóvidos la prolactina no influye demasiado en la continuación de la lactación. En este sentido, en estos animales, es más importante el efecto de la somatotropina y de las hormonas que esta activa, como las IGFs.

Además de los efectos mencionados sobre las células epiteliales, la prolactina puede, en ciertas circunstancias, promover la síntesis de reguladores intracelulares *supresores de la señalización por citoquinas* (SOCS) (Akers, 2006). Éstos llevarían a cabo una función de modulación de los efectos de la propia prolactina o de citoquinas co-reguladoras. Además de lo mencionado, la prolactina puede activar las vías de señalización de la quinasa Akt y de la MAPK quinasa (Bachelot y Binart, 2007).

*Somatotropina.*— Esta hormona polipeptídica tiene, además de las acciones sistémicas conocidas, claros efectos sobre la mamogénesis y la lactogénesis. La hormona del crecimiento o somatotropina tiene una masa de 25 kDa, se sintetiza en la adenohipófisis, y presenta varias isoformas de distintos pesos debido a mecanismos de corte-empalme alternativos.

El mecanismo transductor de la somatotropina es similar al de la prolactina: dimerización del receptor, acción sobre JAK2, y activación por ésta del STAT5 (Yang *et al.*, 2000). Pero, por otra parte, los efectos de esta hormona son por lo menos duales si se los observa desde el punto de vista de la influencia sobre el desarrollo mamario y de las acciones sobre los mecanismos metabólicos. Estas dos modalidades de efectos en la lactación están bajo distintos mecanismos de regulación y señalización intracelulares. Ello ha sido comprobado a partir de los estudios en ratones portadores de anomalías en la expresión del receptor de hormona de crecimiento (Allan *et al.*, 2002).

Gran parte de los efectos de esta hormona se llevan a cabo a través de los factores de crecimiento, antiguamente las “intermedinas”, denominación ya en desuso entre otras razones porque: a) la hormona del crecimiento no necesita imprescindiblemente de ellas, b) porque la IGFs I y II que eran las principales intermedinas, pueden actuar independientemente respecto a la somatotropina, y c) porque los IGFs tienen una gran similitud con la insulina.

Entre los factores de crecimiento, se distingue principalmente el mencionado Factor de Crecimiento Insulinóide I (IGF-I), que es producido en el hígado y, para el caso, también en las células

del estroma de la glándula mamaria. La somatotropina no tiene un papel desencadenante de la iniciación de la lactogénesis, hecho sobre lo cual hay numerosas pruebas. Si posee, en cambio, clara influencia entre los bóvidos en la estimulación de la lactación (galactopoyesis). Los receptores para somatotropina se encuentran en los hepatocitos y en los adipocitos, pero no parece haber una cantidad importante de receptores de somatotropina en las células alveolares. Empero, sí existen receptores I y II para IGF-I, lo cual explica la acción mediada de la somatotropina.

La presencia de proteínas de unión y transporte de somatotropina en el suero sanguíneo también es importante para comprender la actividad de esta hormona, puesto que la unión de la hormona a ellos la mantiene en los espacios vasculares e impide su unión a receptores celulares. Con las proteínas de unión a la IGF-I ocurre algo ligeramente distinto. Estas proteínas de unión tienen efectos propios, algunas aumentan la actividad de la IGF-I y otras las inhiben. Hay que mencionar que el factor de liberación de somatotropina (growth hormone-releasing hormone, GHRH) parece tener por sí mismo actividad galactopoyética, la magnitud de la cual no es suficientemente conocida. La familia de las IGF será mencionada más adelante en relación a la función de lactancia.

*Lactógeno placentario.*— Esta hormona está constituida por 191 aminoácidos, es producida por el sinciotrofoblasto de la placenta y tiene características que la asemejan a la prolactina. Forma homodímeros con actividad hormonal, estimula la lactogénesis, y se une al receptor de somatotropina en los roedores. Entre otros efectos, se ha mencionado que estimula la síntesis de glucógeno, el transporte de aminoácidos, la proliferación celular y la síntesis de IGF-I.

En los bóvidos, la concentración en la sangre de la vaca es muy pequeña y no parece tener una función muy importante en la lactación. En los ovinos se ha comprobado un efecto paradójico entre la nutrición y la respuesta placentaria (Lea *et al.*, 2007), dado que los aumentos en la alimentación se acompañan de disminución del tamaño de la placenta y disminución de la síntesis de progesterona y de la hormona lactógeno placentario, obteniéndose como consecuencia crías de menor peso al nacer.

No es inesperado, dada su estructura, que el lactógeno placentario tiene la particularidad de unirse a los heterodímeros de re-

ceptores de prolactina y hormona del crecimiento, para llevar a cabo algunos de sus efectos (Herman *et al.*, 2000). Asimismo el lactógeno placentario tiene un fuerte efecto, aparentemente junto a las otras hormonas estructuralmente relacionadas (la hormona del crecimiento, la prolactina, y la proliferina) en la vascularización de nuevos tejidos (Corbacho *et al.*, 2002). Esta capacidad angiogénica no es compartida por otra proteína integrante de la misma familia, la *proteína relacionada a la proliferina*, la cual inhibe la angiogénesis.

Entre otros efectos, el lactógeno placentario promueve la proliferación y migración de las células epiteliales mamarias, actuando en forma sinérgica con la lisil-oxidasa una enzima que cataliza la unión de colágeno y elastina (Polgar *et al.*, 2007). Curiosamente, los polimorfismos de esta hormona y de la hormona del crecimiento han sido vinculadas, en nuestra especie, con problemas de síndrome metabólico en la edad adulta y con problemas de crecimiento en la niñez (Day *et al.*, 2004).

*Glucocorticoides.*— En los bóvidos, el cortisol es el más importante de los glucocorticoides que se relacionan con la lactación. Hay coincidencia en que producen diferenciación lóbulo-alveolar, y posteriormente provocan, en forma sinérgica con la prolactina, la iniciación de la lactogénesis en los bóvidos (Neville *et al.*, 2002; Akers, 2006). Durante la gestación su concentración en la sangre es baja.

Unas horas antes del nacimiento, los niveles sanguíneos aumentan enormemente, para descender luego del parto. Se ha observado que el efecto de sustentabilidad de la función de la glándula mamaria durante la lactación tiene una representación concreta en la prevención de la apoptosis por parte de los glucocorticoides y la progesterona. En ausencia de estas dos hormonas, la glándula mamaria comete apoptosis y empieza a involucionar, de la misma forma que lo hace en el período de secado. Cuando se reemplazan externamente las hormonas faltantes la apoptosis no se produce (Berg *et al.*, 2002).

Los glucocorticoides generalmente están unidos a una proteína transportadora (corticosteroide binding globulin, CBG), la cual les reduce su actividad. Cuando disminuye la concentración de CBG se produce un aumento de la fracción libre de los glucocorticoides y de su actividad. La CBG disminuye durante un corto período perinatal.

Los glucocorticoides se unen a receptores específicos del citoplasma y luego a elementos génicos nucleares que promueven la síntesis proteica. En este sentido existe una síntesis diferencial de  $\alpha$ -lactalbúmina y de  $\beta$ -caseína. Se considera que los glucocorticoides con sus receptores actúan mediante dos vías diferentes según intervengan sobre la síntesis de proteínas lácteas, para lo cual interactuarían con proteínas de la vía de STAT5, o que ejerzan sus efectos sobre el crecimiento epitelial, lo cual realizarían directamente a través de la unión a los elementos específicos de ADN (Reichardt *et al.*, 2001). En los roedores, el cortisol es más galactopoyético que en los bóvidos.

*Hormonas tiroideas.*— Como es conocido, la forma activa entre las hormonas tiroideas es la triiodotironina ( $T_3$ ), formada a partir de la más conocida y abundante tiroxina ( $T_4$ ) mediante la acción de una deiodinasa en el riñón, en el hígado, y en la glándula mamaria. Normalmente la conversión de  $T_4$  a  $T_3$  se lleva a cabo solamente en los tejidos extramamarios, pero durante la lactación, esta conversión se hace principalmente en la glándula mamaria. Ello permite que esta glándula tenga un mayor aporte, e influencia, de esta hormona. Todo parece indicar que la unión a los receptores citoplasmáticos, su translocación al núcleo y su unión a los receptores promotores, tiene un efecto necesario y permisivo para la actividad de la glándula mamaria.

*Insulina.*— Esta hormona no tiene mucho efecto sobre el desarrollo y la diferenciación de la glándula mamaria, pero sí en las etapas de lactogénesis I y II. En roedores, la insulina incrementa la utilización y captación de glucosa y de lípidos por el tejido mamario durante la lactación. Por otra parte, en la misma época, el tejido adiposo disminuye su respuesta a la insulina. Ello pone a disposición de la glándula mamaria el sistema de captación de nutrientes circulantes en detrimento de los depósitos usuales de la economía.

En los bóvidos, en cambio, el tejido mamario no responde a la insulina para la captación de glucosa, acetato y triglicéridos. En cambio, en estos animales, el tejido adiposo sí responde a la insulina aumentando la captación de acetato para la síntesis de lípidos. Los aumentos de insulina en la sangre de la vaca no se corresponden con aumentos de la producción de leche.

Es interesante el efecto que lleva a cabo la insulina sobre la expresión de la lipoproteinlipasa (LPL) durante la lactación en roedores. Esta enzima se presenta con actividades altas en el tejido adiposo, pero también en el músculo esquelético, corazón, y en la glándula mamaria. En este órgano, se sintetiza en las células adiposas del estroma. La regulación de su actividad se efectúa a través de varios mecanismos, sistémicos y locales. Uno de estos mecanismos está a cargo de la insulina (Ramos *et al.*, 1999), a la cual responde aumentando la actividad de LPL y la cantidad del RNAm correspondiente.

*Inhibidor de Lactación por Retroalimentación (FIL).*— Este péptido de 7600 Da es capaz de inhibir la síntesis láctea en una forma localizada y específica en el tejido mamario. Es producido por la misma glándula mamaria, donde actúa de manera paracrina. El estímulo para su secreción es la falta de excreción del volumen lácteo fuera de la glándula (Wilde *et al.*, 1995). La permanencia de la leche produce repleción y debida a ésta, en horas, se empieza a sintetizar este péptido. El efecto se produce sobre la misma parte de la glándula que lo sintetiza. Si hubiera vaciamiento de una de las glándulas, esta deja de producir el péptido y sigue produciendo leche. Esta molécula, que actúa como una hormona local, ha sido estudiada en las cabras y vacas, también se la ha encontrado en canguros (Hendry *et al.*, 1998).

La diferenciación de la glándula mamaria se lleva a cabo en la pubertad bajo la influencia de varias hormonas, principalmente la prolactina y los estrógenos. A los efectos hormonales hay que agregar la influencia de las interacciones tisulares, en el caso de la glándula mamaria se destacan la interacción entre el epitelio que dará lugar al tejido secretor, por una parte y los adipocitos por otra. Esta interacción será importante para el desarrollo de los conductos mamarios y la morfogénesis de la glándula. El FIL no parece tener, por lo que se conoce, otros efectos que los de regulación local. El efecto se generaliza y afecta toda la glándula si se separan las crías de la madre.

*Leptina.*— Esta hormona es producida por los adipocitos. Tiene una masa de 18,6 kDa. Interviene en la regulación del peso, aumentando el metabolismo basal y, en el mismo sentido, la saciedad. Lleva a cabo efectos lipolíticos, estimula la oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa. El receptor de leptina se

encuentra en los tejidos periféricos donde tiene los efectos metabólicos mencionados y en el sistema nervioso central donde, además, afecta el comportamiento alimentario. En el hipotálamo, regula el apetito, disminuyendo la ingesta. Por otra parte, la leptina está comprometida en la regulación de la respuesta inmune y los procesos inflamatorios. Interviene igualmente en la hematopoyesis y la angiogénesis. La leptina se expresa además de los tejidos adiposos pardo y blanco, en la placenta, los tejidos fetales, la glándula mamaria, músculos, y el estómago. El RNAm del receptor de leptina fue encontrado en el tejido mamario de ovinos y de bovinos (Silva *et al.*, 2002). El receptor de leptina es una proteína transmembrana que pone en funcionamiento el sistema de señalización JAK2/STAT3. Este receptor tiene varias isoformas que parecen originarse mediante corte-empalme alternativo. La expresión de las isoformas depende del tejido (UPKB/SP: *UniProtKB/Swiss-Prot*). La leptina inhibe el crecimiento inducido por el IGF-I, y para ello actuaría en forma paracrina.

La expresión del receptor de leptina puede ser incrementada por la prolactina en más del doble en tejido mamario de animales en lactación, también en animales preñados (Feuermann *et al.*, 2004). Esta expresión cambia a medida que transcurre el proceso de manera que, al principio de la preñez, el receptor se sintetiza en las células adiposas de la glándula, luego en las células epiteliales durante la diferenciación de éstas y después que se ha producido el nacimiento de la cría, se expresa en las células mioepiteliales (Bonnet *et al.*, 2002). Asimismo, en animales lactantes, la leptina aumenta la síntesis de ácidos grasos en presencia de prolactina, y lo mismo ocurre en explantes de tejido mamario para la síntesis de  $\alpha$ -caseína y  $\beta$ -lactoglobulina. Estos efectos parecen llevarse a cabo mediante una estimulación autocrina (Feuermann *et al.*, 2004).

Uno de los aspectos más llamativos de los efectos de la relación de la leptina con la lactación es el que corresponde a la regulación de la acción termogénica durante este período. Ello ocurre de manera tal que la acción termogénica es disminuida para ahorrar energía que será encauzada a la síntesis de componentes de la leche. Esta intervención se lleva a cabo, entre otros efectos celulares, mediante la inhibición de la síntesis y función de las proteínas desacoplantes (UCP) de la fosforilación oxidativa (Xiao *et al.*, 2004). Parte de las causas se originan en una hipoleptinemia. La misma causa produce una hiperfagia depen-

diente de las necesidades que enfrenta la madre según el número de crías, entre otras variables moduladas (Denis *et al.*, 2003).

## LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Es digno de mención el hecho que la mayor parte de los factores de crecimiento conocidos tienen, en algún momento de la mamogénesis o la lactogénesis, participación en la función de la glándula mamaria. Asimismo se da la circunstancia que la mayor parte de los efectos que estos factores llevan a cabo, lo hacen a través de los mecanismos de secreciones paracrinas o autocrinas. Estos mecanismos de acción local poseen notorias ventajas, en primer lugar que al no ser sistémicos, el efecto de cada uno de ellos se asegura la respuesta circunscripta de la zona. Ello es muy eficiente y funcional por el hecho que no interfiere con sus posibles efectos sobre otros órganos para los cuales pudiera ser (circunstancialmente) inconveniente la estimulación hormonal correspondiente. Otra ventaja notoria es la economía de mensajeros químicos.

En lo que sigue se describirán los efectos de los factores de crecimiento acerca de los cuales existe información que los relacionan con la glándula mamaria.

*Los factores de crecimiento insulinoideos.*— Además de ser sintetizadas y liberadas por el hígado, con lo cual llevan a cabo efectos sistémicos, las IGFs se producen en distintos tejidos y pueden en estos casos actuar en formas paracrina, autocrina e incluso sistémicas (Akers, 2006). Uno de los casos particularmente interesantes es la síntesis de IGF-I por las células del estroma de la glándula mamaria, llevando a cabo efectos locales, particularmente actuando sobre las células epiteliales vecinas. Varios de los efectos de la hormona del crecimiento son efectivizados por la síntesis en la glándula mamaria del IGF-I y de sus proteínas de unión (Weber *et al.*, 2000). Los efectos de los IGFs se han mencionado varias veces al describir las acciones que directa o indirectamente llevan a cabo tanto las hormonas metabólicas como las reproductivas. Como se ha dicho, en el organismo también se sintetiza proteínas de unión a las IGFs, las *IGF binding proteins* (IGFBP), las cuales pueden servir de transporte, como así también pueden inhibir o amplificar sus efectos.

La activación del receptor de IGF-I puede señalar a través de varias vías intracelulares: a) por activación de las proteínas RAS que inducen proliferación celular, b) por activación de la  $\beta$ -cateninas que producen efectos similares, c) por activación de proteínas de la familia 14.3.3 uno de cuyos efectos está relacionado con la supervivencia celular, y d) por activación de IRS-1 que tiene funciones que se superpondrían con la anterior.

La mencionada familia de proteínas 14.3.3 tiene por lo menos seis integrantes (Yang *et al.*, 2006) ampliamente distribuidos en animales y plantas en los que tienen gran número de funciones: regulación del metabolismo, transducción de señales, ciclo celular, apoptosis, y respuestas al estrés. Se ha observado que el IGF-I también influye en la vía de activación del STAT5 cuando se utilizan las dosis propias de los ensayos de cultivos de explantes (Yang *et al.*, 2000).

Los efectos de las IGFBP se extienden más allá de la inhibición de los efectos de la IGF-I. Cuando se llevan a cabo ensayos de explantes de tejido mamario en los que no se han incluido la prolactina, la somatotropina y el IGF-I se produce un aumento en la expresión de la IGFBP-5, como así también de la apoptosis del tejido mamario (Accorsi *et al.*, 2002). Ello pone de manifiesto la intervención de esta IGFBP en los procesos de involución de la glándula mamaria.

*Los factores de crecimiento epidermal.*— Si bien los primeros hallazgos demostraron su influencia en la estimulación del crecimiento y proliferación de células epiteliales, la información posterior sobre sus efectos amplió el espectro tisular de su actividad (Hynes *et al.*, 1990; Doppler *et al.*, 1991). Esta familia incluye varios factores de crecimiento: a) el EGF, b) el factor de crecimiento transformante  $\alpha$ , c) el factor de crecimiento epidermal de unión a la heparina, d) la anfirregulina y e) la neuroregulina.

Estos factores se unen a receptores de membrana del tipo de las tirosina-quinasas. En general, estos receptores se encuentran en las células de la glándula mamaria de las zonas de rápido crecimiento, sean epiteliales o del estroma circundante.

*Los factores de crecimiento de fibroblasto.*— Como ya se ha mencionado, gran parte de los nombres de proteínas y péptidos activos provienen del tejido en los cuales se los ha descubierto. Este factor FGF tiene afinidad por polímeros de la matriz extra-

celular, por ejemplo, los glicosaminoglicanos, actúan de una manera paracrina sobre las células epiteliales estimulando su crecimiento y la ramificación de los conductos. Se conocen algunas variantes que actúan sobre la glándula mamaria: FGF-1, FGF-2 y FGF-7. Entre sus funciones generales se destacan la regulación del crecimiento y la diferenciación celular.

En la adenohipófisis, actúan sobre las células que sintetizan prolactina promoviendo su desarrollo y su diferenciación. Asimismo estimulan la síntesis y secreción de esta hormona (Yu *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2003). Para hacerlo actúan sobre una vía de señalización especial que activa la MAPK quinasa (Jackson *et al.*, 2003).

*Los factores de crecimiento transformantes  $\beta$ .*— Estos factores de crecimientos se presentan en, por lo menos, tres formas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, los cuales estimulan el crecimiento del tejido conectivo. El TGF- $\beta$ 1 actúa también sobre el epitelio glandular. En general, este factor inhibe el crecimiento epitelial, actuando como modulador del crecimiento incontrolado. Este es un efecto que también lo lleva a cabo la leptina. En varios aspectos, los efectos que lleva a cabo el TGF- $\beta$  son contrarios a los que ejercen la prolactina y los factores de crecimiento asociados sobre la morfogénesis. Ello se debe a la activación del factor Akt por la prolactina y su inhibición por el TGF- $\beta$  (Bailey *et al.*, 2004). El factor Akt (protein kinase B/PKB) es un importante nudo en las vías intracelulares de señalización.

## LA INFLUENCIA DE LAS PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Este es un campo en activo crecimiento, no solamente por la influencia que estas proteínas tienen en el órgano de la glándula mamaria sino también por las que ejercen sobre todos los órganos y sistemas de la economía. A su vez, estas moléculas actúan en forma interdependiente con las hormonas que operan sobre el epitelio glandular. Se sabe que la *molécula de adhesión celular dependiente de glicosilación 1* (GlyCAM 1) depende de la presencia y la estimulación producida por la prolactina, y que la progesterona a su vez, inhibe su expresión (Hou *et al.*, 2000).

Los factores de transcripción que se activan por la influencia de la(s) señal(es) de la matriz extracelular son varios. Entre es-

tos, se pueden mencionar STATs, NF- $\kappa$ B, proteínas de dominio Ets, Factor octamérico, y amplificador de CCAAT, todos los cuales actuarían como activadores sobre las regiones promotoras de los genes. Asimismo los factores de transcripción YY-1 y el mismo amplificador de CCAAT, en ciertas condiciones, se desempeñarían como represores (citados por Doppler *et al.*, 2000). Es necesario mencionar que los péptidos Ets constituyen una familia muy grande de factores de transcripción que tiene a su cargo una gran cantidad de funciones de co-regulación génica (Oettgen, 2006).

En el caso particular de la glándula mamaria se ha comprobado que prácticamente todas las estructuras proteicas extracelulares más importantes (por su distribución en todo el organismo) tienen influencia moduladora sobre su actividad. Incluso esta influencia es determinante en las respuestas de las células asociadas en lo que respecta a la proliferación inducida por hormonas tales como EGF, IGF-I, estrógenos y progesterona. En este sentido, se evidencia la capacidad de inducir respuestas por parte del colágeno I, el colágeno II, la fibronectina, y la laminina (Wodward *et al.*, 2000). De esta forma, la capacidad del estroma de influenciar sobre las células que soportan se puede efectuar ya sea segregando factores de crecimiento o cambiando *los tipos de proteínas que forman la matriz extracelular* la cual es común a ambos tipos celulares.

*La transcripción y los genes de las principales proteínas lácteas.*— Cuando nos referimos a las principales proteínas lácteas, en este caso, lo hacemos teniendo en mente a los genes de las cuatro caseínas, al de la  $\alpha$ -lactalbúmina y al correspondiente de la  $\beta$ -lactoglobulina. Para todas ellas se ha mencionado la alta correlación existente entre los niveles de proteínas sintetizadas y los correspondientes a la cantidad de RNAm presentes en las células del epitelio secretor. Mercier y Vilotte (1993) mencionan que durante la lactación (galactopoyesis) se produce un aumento de la transcripción de dos a cuatro veces sobre lo normal y una estabilización de los RNAm tal que representa un incremento de unas veinte veces el valor de la vida media de los RNAm.

En lo que sigue, se detallará lo relacionado con los genes de las caseínas y se hará referencia a las dos proteínas del lactosuero cuando su activación se haga en forma conjunta con las caseínas.

La estructura de los genes de caseína no difiere demasiado de las correspondientes al resto de proteínas que son específicas de algunos tejidos. La unidad de transcripción que será representada en el RNAm desde el extremo 5' hasta el extremo 3' contiene: el sitio de la secuencia destinada al casquete metil-guanilato-trifosfato ( $M_7Gppp$ ), los sitios identificadores que se requieren para el proceso de corte y empalme, el sitio señal para la poliadilación de la cola y una secuencia de nucleótidos rica en GT relacionada con el fin de la transcripción.

Además, en el extremo 5' se encuentra la caja ATA y los motivos que indican el sitio de transcripción para la RNA polimerasa II y para el factor de transcripción TFII D. Asimismo, en el extremo 5', existen varios sitios que contienen elementos que son reconocidos por factores que modulan la expresión de estas proteínas. Los factores, y los motivos reconocibles, se corresponden con el tejido y al estado fisiológico, para el caso el estadio de la preñez y de la lactación. Algunos de estos motivos se encuentran en el propio extremo 5', otros son distales, otros se encuentran dentro de la propia unidad de transcripción y otros en el extremo 3'.

Una de las características de los genes de las caseínas corresponde a la estructura de la relación topológica de los intrones y exones: la inserción de los intrones está localizada de forma tal que prácticamente ninguno de ellos interrumpe un exón, situación denominada de fase 0 (cero). Esta situación, que corresponde a una historia evolutiva en la que se destacan los procesos de duplicación de los exones, permite deducir la relación entre distintos genes que tienen un origen (antecesor) común y la época (edad, en el sentido histórico) en que se han producido las diversificaciones que llevaron a la situación actual.

En las secuencias reguladoras del extremo 5' se han identificado los elementos de reconocimiento de receptores de glucocorticoides, receptores de progesterona y de varios otros factores que son necesarios para iniciar la transcripción.

*El RNA mensajero.*— La estructura general de el RNAm incluye: un casquete 5' ( $M_7Gppp$ ); luego la región correspondiente al marco de lectura, que tiene una extensión cercana a dos tercios del total de RNAm, delimitado por un codón de iniciación y otro de terminación; y el extremo 3' con regiones no traducidas en el cual se encuentran: la secuencia señal de reconocimiento para la

poliadenilación del extremo 3', el sitio de la señal de reconocimiento que se encuentra entre 13 a 20 nucleótidos corriente arriba del correspondiente al comienzo de la cola de poli(A).

Desde el punto de vista evolutivo, se considera como regiones muy conservadas: a) las correspondientes a los extremos 5' y 3', b) los péptidos señales, y c) las secuencias de los sitios donde se lleva a cabo la fosforilación de las proteínas. Se estima que estos sitios tienen importancia en los mecanismos de traducción y de mantenimiento de la estabilidad del RNAm (Mercier y Vilotte, 1993). Es significativo que los péptidos señal de las caseínas son prácticamente iguales en ocho especies de mamíferos placentarios y un marsupial (Mercier y Vilotte, 1993).

*Regulación endócrina de la transcripción en la síntesis de proteínas lácteas.*— En general, las hormonas producen la activación de factores de transcripción que se unirán a elementos específicos de las regiones de activación y represión de los genes. Ello se lleva a cabo en forma mediada, y en varios pasos en los que los factores de las vías de señalización pueden interactuar con el producto de la acción de otras hormonas o factores de crecimiento. Existen dos regiones promotoras, una proximal y otra distal. Esta última está ubicada entre los 1000 y 4000 nucleótidos corriente arriba, según la especie. La región 5' inmediata proximal (y corriente arriba) del gen contiene, en un espacio de no más de 300 nucleótidos, los sitios de unión de los factores de transcripción.

En la Figura 16 (como se citará más adelante), se muestran estas dos regiones en los genes de la  $\beta$ -caseína de vaca y humano. Uno de los propósitos del gráfico es exponer la gran similitud que demuestra la conservación de la estructura de estos genes entre especies que se han separado hace más de 60 millones de años. Estas regiones, denominadas en este caso *regiones de respuesta hormonal lactogénicas*, tienen varios componentes en común con las regiones homólogas de otros genes, y otros elementos que les son propios. Como se ve, poseen uno o más sitios para la unión de los STATs, tanto en la región proximal como en la región distal. Asimismo tiene sitios CCAAT para proteínas amplificadoras de unión a estos. Algunas de éstas, las C/EBP se unen también en las dos regiones, proximal y distal.

El factor YY1 reprime al unirse al sitio específico, la síntesis de la  $\beta$ -caseína. Este sitio ha sido localizado y estudiado muy

bien en roedores. Aparentemente la unión de STATs a los sitios correspondientes (ceranos) impide la unión de YY1, de manera tal que se impide la represión por este factor.

Los receptores de los glucocorticoides se unen a elementos de la zona proximal. Aparentemente se unen en forma previa al STAT5, lo que aumenta la afinidad del complejo por algunos de los sitios de unión correspondientes en el DNA. Los receptores de glucocorticoides se unirían a *medios-sitios* de secuencias palindrómicas y esta unión sería impulsada por la unión previa a STAT5. Además de lo descrito, los receptores de glucocorticoides promueven la fosforilación final de STAT5, lo que termina de activar a este factor. La mutua necesidad de dos factores de transcripción para su unión a los sitios específicos es una interesante demostración de la interacción entre los efectos de dos hormonas, para el caso los glucocorticoides, que activan el receptor de glucocorticoide, y la prolactina que activa, mediadamente, el STAT5.

En forma contraria a la descrita, otro factor de transcripción, el NF- $\kappa$ B que es resultante de la activación por el Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), tiene la capacidad de inhibir un paso previo a la activación final, consistente en la fosforilación, del STAT5. El NF- $\kappa$ B se une a su propio sitio e impide la síntesis de la  $\beta$ -caseína.

Otro sitio de unión en la región proximal corresponde a la *Proteína octamérica*, la cual actúa en forma co-regulante con los otros factores de transcripción. En la región distal, se encuentra asimismo un sitio de unión para Ets.

*Influencia endócrina sobre la traducción en la síntesis de proteínas lácteas.*— Una gran cantidad de trabajos se han escrito sobre los varios pasos que culminan en la síntesis de proteínas lácteas. El último paso en el que están comprometidos los ácidos nucleicos es el que corresponde a la traducción desde el RNAm a la molécula proteica. En las proteínas lácteas, como ocurre con otras proteínas, la regulación de la síntesis se efectúa, con distinta eficacia, en todos sus pasos. La regulación de la transcripción, como se ha expuesto, constituye una etapa importante y una de las más delicadas y complejas. Un paso importante, aún cuando se lo aprecia más como un estado que como un mecanismo, es el correspondiente a la estabilización del RNAm. Ahora ya es casi obvio el hecho que es necesario que el RNAm tenga una

vida media prolongada para ser más eficiente en la síntesis proteica. Ello se logra con los mecanismos de estabilización, los cuales permiten incrementar su traducción, puesto que una vida media muy corta no garantiza la síntesis de la suficiente cantidad final de proteína.

Otro aspecto es el correspondiente a la síntesis diferencial de proteínas. Por ejemplo, es sabido que la  $\kappa$ -caseína se sintetiza en cantidades mucho menores que la  $\beta$ -caseína. La información actual autoriza a pensar que tanto la estabilización del RNAm como la síntesis diferencial están bajo los mismos mecanismos de modulación (Rhoads y Grudzien-Nogalska, 2007). Desde luego que la actividad de estos mecanismos difiere en lo que se refiere a una y otra proteína, residiendo esta diferencia en los sectores génicos reguladores.

Como se ha dicho anteriormente, la síntesis de lactoproteínas exige la presencia de insulina, glucocorticoides y prolactina. Cada una de estas hormonas, aisladas o en pares no son suficiente para inducir la síntesis. Los glucocorticoides potencian la acción de la prolactina, aumentando la cantidad de RNAm, pero aisladamente no tienen efecto. Por otra parte, la inyección de progesterona detiene la síntesis de estas proteínas y de los RNAm correspondientes (Houdebine *et al.*, 1985).

Hay ensayos en los que se demostró que la administración de prolactina, estradiol e hidrocortisona a animales ovariectomizados aumenta la cantidad de RNAm de caseína. Para el caso, el estrógeno tiene un efecto permisivo, lo cual es evidente cuando se trata con animales ovariectomizados.

Para que se lleve a cabo una síntesis activa de caseína es necesario que se incremente la síntesis de RNAm y que ésta sea estabilizada: se sabe desde hace muchos años que la prolactina incrementa a más del doble la síntesis de RNAm de caseína, y que, lo más importante, la vida media de este RNAm aumenta 20 veces (Guyette *et al.*, 1979). Este aumento de la vida media explica el aumento de la síntesis de caseína.

Los glucocorticoides y la insulina, por otra parte, aumentan la transcripción del RNAm, pero actúan en forma menos importante sobre la estabilidad de éste. Sobre este aspecto parecen existir diferencias entre especies (Rhoads y Grudzien-Nogalska, 2007).

Los trabajos existentes sobre la importancia relativa de la síntesis de RNAm, por una parte, y el aumento de la estabilidad de éste por otra, parecen indicar que existen dos vías y que

ambas dependen de los mecanismos de poliadenilación. Estos mecanismos residen estructuralmente en el casquete, en la cola de poli-A del RNAm y en elementos que se encuentran en el lado 3' no traducible, los cuales interactúan con factores (proteínas) trans-actuantes. Algunas de estas proteínas promueven la estabilidad y otras estimulan la degradación de las colas de poli-A del RNAm.

Otro hecho que afecta la síntesis de lactoproteínas es el producido por la desaparición del estímulo que es producido por la presencia de la cría. Ello produce una disminución de la traducción.

En lo que respecta a la traducción, dos hormonas juegan un papel central; por una parte, la insulina (o alguno de los factores de crecimiento relacionada con ésta, que actúe en forma paracrina o autocrina), y por otra parte, la prolactina. Estas hormonas actuarían sinérgicamente sobre la quinasa Aurora A, la cual fosforilaría al factor de unión del CPE (elemento citoplasmático de poliadenilación). Esta fosforilación de la proteína de unión estimularía la traducción, permitiría la actividad de la polimerasa, e impediría la acción de la ribonucleasa que es la encargada del acortamiento del poli-A.

Otro aspecto muy interesante consiste en la estimulación de la síntesis de lactoproteínas por aminoácidos libres de la sangre, reconocida en la leucina, a través de un sistema que involucraría a mTOR y a la fosfatidil-inositol 3 quinasa (Moshel *et al.*, 2006). Estos efectos de la leucina habían sido demostrados por Kimball *et al.* (1999) en ensayos en los cuales la leucina estimula la fosforilación de un factor de traducción del RNAm (eIF4E) en miocitos.

Lo relacionado con la poli-A-adenilación del RNAm parece tener varias vertientes. Por ejemplo, se conoce desde hace algunos años que el RNAm de la  $\alpha$ -lactalbúmina se encuentra en la glándula mamaria en dos formas: con y sin la cola de poli-A-adenilación (Hall *et al.*, 1981).



## Los oligómeros de caseínas y las proteínas micelares asociadas

---

Como se ha mencionado anteriormente, existen dos aspectos estructurales de las caseínas que no han sido desarrollados en la bibliografía y que consideramos que son importantes en una revisión comparativa sobre el tema: la presencia de polímeros de caseínas de diferentes tamaños entre los cuales son dominantes los oligómeros, y la existencia de proteínas no caseínicas asociadas a las micelas de caseínas en la leche de diferentes especies. En esta parte de la revisión que presentamos hacemos referencia a estos temas, incluyendo resultados obtenidos en nuestro grupo de trabajo, en especial a los correspondientes a la Tesis Doctoral de Marcela Hernández de Sánchez, parte de cuya información utilizamos aquí. En el presente trabajo, se muestran en esquemas los resultados de las electroforesis efectuadas.

En el marco descrito y explicitado en las secciones previas y con el objetivo mencionado se exponen resultados obtenidos con muestras de caseínas de distintas especies, los cuales tratan sobre la identidad comprobada o presuntiva de las bandas electroforéticas de proteínas a partir de diferentes tipos de ensayos. La información obtenida incluye a los oligómeros de caseínas y a las proteínas asociadas a las micelas de caseínas.

En la primera parte, se muestran y analizan, para cada especie, los resultados de electroforesis de proteínas correspondientes a las estructuras mencionadas. Para una mejor comprensión y a los fines comparativos se analizan cada una de las especies por separado.

Las especies estudiadas fueron las siguientes: corzuela (*Mazama gouazoubira*), venado de las pampas (*Ozotocerus bezoarticus*),

ciervo europeo (*Dama dama*), cabra (*Capra hircus*), oveja (*Ovis aries*), alpaca (*Lama pacos*), llama (*Lama lama*), tapir (*Tapirus terrestris*), yegua (*Equus equus*), lobo marino (*Otaria flavescens*), elefante marino (*Mirounga leonina*), armadillo (*Chaetophractus vellerosus*), oso hormiguero (*Myrmecophaga tridactyla*), humano (*Homo sapiens*). Además de lo mencionado, en algunas de las determinaciones sobre glicosilación se analizaron caseínas y proteínas micelares de leche de perra y de coatí.

Para un más adecuado ordenamiento y comprensión haremos una sucinta referencia a los aspectos metodológicos del tema. Las caseínas de muestras de leche fueron precipitadas llevando el pH de ésta a 4,6 o 4,3 según la especie. El precipitado fue lavado repetidas veces, primero con agua destilada y luego con solución tamponada sin detergentes a pH 7,2. Luego el precipitado fue disuelto en la solución utilizada para electroforesis.

Las electroforesis, que en todos los casos se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida (PAGE) se efectuaron en dos condiciones: sin agentes reductores (S/ar) y con agentes reductores (C/ar). Los agentes reductores a los cuales hacemos referencia son el  $\beta$ -mercaptoetanol y el ditiotreitól. Como consecuencia de las condiciones no reductoras correspondiente a las PAGEs realizadas en ausencia de agentes reductores (S/ar), las uniones disulfuro originales existentes entre las cadenas proteicas son conservadas y, por lo tanto, se mantienen también, en caso que los hubiera, los oligómeros de caseínas de diferentes pesos moleculares. De esta manera, después de efectuarse las electroforesis se pueden poner en evidencia bandas adicionales y de mayor peso molecular que aquellas que corresponden a los monómeros.

De la misma forma, cuando se trabajó en presencia de agentes reductores (C/ar), los oligómeros se reducen por la ruptura de los puentes disulfuro que unían las cisteínas de los péptidos —o las uniones intracatenarias— y se observan solamente los monómeros que constituían los oligómeros, lo cual hace que disminuya el número de bandas presentes en el gel.

Como se verá más adelante, el hecho que disminuya el número de bandas observables en las electroforesis con agentes reductores se debe a que los oligómeros de distintos pesos moleculares están formados por no más de tres, generalmente uno o dos “especies” de monómeros. En casi todos los casos los oligómeros están formados por solamente tres tipos de caseínas, según se ha expuesto en las secciones anteriores, y los monómeros

mencionados corresponden:  $\kappa$ -caseína,  $\alpha_{s1}$ -caseína o  $\alpha_{s2}$ -caseína.

Las electroforesis se fotografiaron o se escanearon, y se confeccionaron diagramas de las bandas presentes. Para todos los casos, las distancias de migración se dibujaron proporcionales a las de los geles y, de la misma manera, las intensidades de las bandas de estos gráficos son indicativas de las correspondientes a la tinción de cada banda electroforética. La información de las fotografías digitales o la imagen digital escaneada fue analizada densitométricamente mediante un software (QuantiScan, Biosoft) que permite cuantificar la cantidad relativa de proteína en cada banda electroforética. La identificación tentativa de las distintas bandas se llevó a cabo en base a: el desplazamiento relativo de cada una, a la presencia de glúcidos, y al cambio relativo de intensidad de las bandas antes y después del tratamiento con agentes reductores.

También se describen los resultados correspondientes a la separación de las caseínas por Sephacryl S-200, en los cuales los picos de elución obtenidos de las distintas caseínas se sometieron ulteriormente a electroforesis en SDS-PAGE en presencia o ausencia de agentes reductores. En algunos casos durante el fraccionamiento por Sephacryl S-200, ciertos tipos de proteínas eluyeron conjuntamente, aún cuando poseían masas moleculares distintas, demostrando asociaciones que seguramente también corresponden a uniones establecidas en la propia leche. El comportamiento de estas asociaciones de proteínas de diferentes pesos moleculares se analiza más adelante. El fraccionamiento de las caseínas por Sephacryl S-200 se realizó en condiciones no reductoras, en las cuales se conservan los enlaces disulfuro entre cadenas proteicas.

En lo que se describe a continuación se incluyen los datos correspondientes a concentraciones de proteínas totales, proteínas del lactosuero y caseínas de todas las especies en que fueron determinadas (Tabla 1). Los resultados que se presentan en esta Tabla corresponden a las muestras que fueron utilizadas en los ensayos que se llevaron a cabo para investigar la presencia de los ya mencionados oligómeros de caseínas y de las caseínas asociadas a las micelas. Las muestras de cabras correspondían a la raza Criolla.

En lo correspondiente al *número de caseína* (el porcentaje del total de proteína que les corresponde a las caseínas), los valores de los unglados son, en general, mayor a un 50%, salvo el caso del

ciervo, lo cual coincide con los antecedentes conocidos al respecto. En general, los datos obtenidos son congruentes con la información contenida en la bibliografía. Hay algunos casos en que nuestros resultados se apartan de las medias conocidas; pero ninguna de ellas se aleja mas de un desvío estándar de los datos poblacionales que nuestro grupo ha obtenido en experiencias anteriores, o de la información existente en la bibliografía.

Con los resultados de los análisis densitométricos de todas las PAGEs realizadas, se obtuvo la información que se presenta en la Tabla 2. Como se puede apreciar, al promediar los valores obtenidos en diferentes especies, el valor medio que representan los monómeros de caseínas, respecto al total de las proteínas en las micelas, es un 77%, mientras que para los oligómeros de caseínas es de un 11%. Para las proteínas asociadas a las micelas, encontramos un valor muy alto, pero ello se debe a la fuerte influencia, probablemente distorsionante, que tiene sobre la media el valor que corresponde a la especie humana.

En la lista presentada, el valor más alto corresponde a la llama y el más bajo al armadillo. En las determinaciones llevadas a cabo con numerosos animales de la misma especie, como hicimos con muestras de leche de cabra, hemos observado que los porcentajes correspondientes a los oligómeros de caseínas tenían un coeficiente de variación muy pequeño. Este coeficiente repre-

Especies	Prot. tot. (g %)	PLS (g %)	Caseínas (g %)	Nº de caseínas (g %)
corzuela	6,50	1,65	4,84	74
venado de las pampas	9,26	2,64	6,62	72
ciervo europeo	8,07	4,92	3,15	39
cabra	3,28	0,7	2,58	78
oveja	5,35	0,72	4,64	86
alpaca	5,71	0,87	4,84	84
llama	4,24	1,01	3,16	74
tapir	8,76	4,1	4,66	53
yegua	1,82	0,89	0,93	51
lobo marino	8,76	4,76	4,00	45
elefante marino	14,38	7,35	7,03	49
armadillo	7,83	4,14	3,69	47
oso hormiguero	4,79	2,86	1,93	40
humano	0,96	0,66	0,30	31

**Tabla 1.** Proteínas totales, proteínas del lactosuero, caseínas y número de caseínas existentes en la leche de las especies estudiadas.

Especies	Monómeros (%)	Polímeros (%)	PAM (%)
corzuela	83,76	3,04	13,20
venado de las pampas	78,81	9,22	11,97
ciervo europeo	72,74	14,1	12,77
cabra	90,69	9,31	PAM = Polim.
alpaca	83,87	16,13	PAM = Polim.
llama	60,40	29,85	9,74
tapir	60,60	17,83	21,60
yegua	83,90	3,21	12,89
lobo marino	96,00	1,92	2,07
elefante marino	89,61	10,39	PAM = Polim.
armadillo	82,80	2,8	14,40
oso hormiguero	73,20	18,35	8,46
mono caí	73,11	5,37	21,00
humano	49,33	12,98	37,69
media	77,1	11,0	15,1
desvío estandar	13,1	7,9	9,2

**Tabla 2.** Porcentaje que, del total de las micelas de caseínas, corresponde a los monómeros de caseínas, sus polímeros y a las proteínas asociadas a las micelas.

sentaba un 11% respecto a la media de los oligómeros y un 1,8% respecto a la media del total de caseínas. Esta dispersión relativamente baja demuestra que la proporción de oligómeros que se forman está regulado de alguna manera tal que, seguramente las medias encontradas representan un punto de equilibrio. Ello es compatible con la comprobación estadística obtenida de la distribución normal de los datos correspondientes.

Los porcentajes correspondientes a las proteínas asociadas a las micelas de caseínas, tienen, como se esperaba, una presencia cuantitativa mucho menor que las caseínas, pero siguen siendo importantes (Tabla 2 y 3). En los casos particulares de la leche de alpaca y de elefante marino, la banda de una *proteína asociada* a las micelas de caseínas se desplazaba a la misma velocidad que *una de las bandas de los oligómeros*, o sea que se superponía. De manera que no se pudieron calcular los valores correspondientes a la proteína asociada. Pero, para el caso, estos valores eran proporcionalmente pequeños, lo que disminuye la importancia cuantitativa de estos solapamientos.

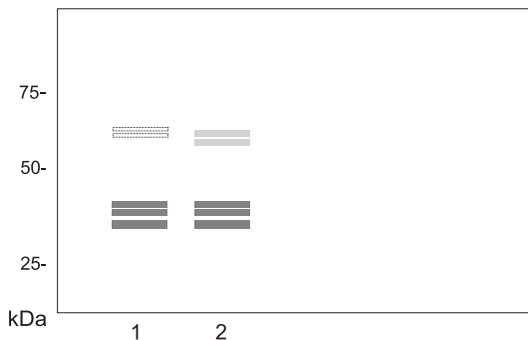
En lo que sigue se describen por separado las características de cada especie.

Especies	Cn tot.	Monom.	Polim.	PAM
corzuela	4,84	4,05	0,15	0,64
venado de las pampas	6,62	5,22	0,61	0,79
ciervo europeo	3,15	2,29	0,44	0,40
cabra	2,58	2,34	0,24	PAM= Polim.
alpaca	4,84	4,06	0,78	PAM= Polim.
llama	3,16	1,91	0,94	0,30
tapir	4,66	2,82	0,83	1,01
yegua	0,93	0,78	0,03	0,12
lobo marino	4,00	3,84	0,08	0,083
elefante marino	7,03	6,30	0,73	PAM= Polim.
armadillo	3,69	3,05	0,10	0,53
oso hormiguero	1,93	1,42	0,35	0,163
mono caí	1,00	0,74	0,05	0,21
humano	0,32	0,15	0,04	0,11

**Tabla 3.** Valores absolutos en g/dL que corresponden a los monómeros de caseínas, sus polímeros y a las proteínas asociadas a las micelas.

### CORZUELA PARDA (*Mazama gouazoubira*)

La Figura 1 muestra los esquemas donde aparecen las bandas de proteínas de las electroforesis efectuadas en las dos condiciones antes mencionadas. En ambas se nota la presencia dominante de dos bandas de caseína cercanas a los 30 kDa. La de mayor

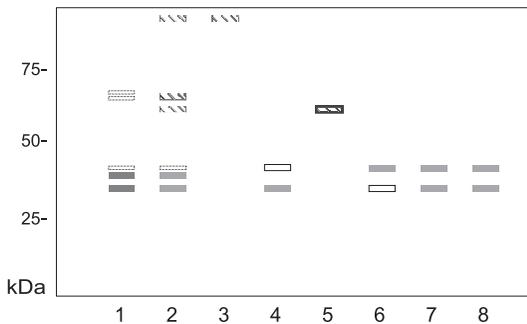


**Figura 1:** SDS-PAGE: Caseínas de corzuela parda.  
Caseínas totales  
1: c/ag. red  
2: s/ag. red

masa molecular aparece como desdoblada cuando se analiza la imagen digital y por ello figura así en el esquema. En la zona de los 60 kDa (PAGE C/ar), se evidencian algunas bandas que podrían corresponder a proteínas asociadas a las micelas de caseína. En el gel sin agentes reductores aparecen además de las bandas mencionadas anteriormente, dos bandas de 58 y 64 kDa aproximadamente. Esta última encubriría a las bandas de proteínas asociadas.

#### VENADO DE LAS PAMPAS (*Ozotocerus bezoarticus*)

La Figura 2 corresponde al esquema de las electroforesis de este otro cérvido sudamericano. En los geles tratados con agentes reductores aparecen: a) tres bandas de caseína de intensidad bastante similar con masas moleculares entre 30 y 37 kDa, b) entre 60 y los 63 kDa, dos bandas de proteínas, las cuales estaban asociada a las micelas de caseína. En el gel sin agentes reductores, además de las bandas de 30 kDa mencionadas anteriormente, aparecen bandas ubicadas entre los 50, 75 kDa y 200 kDa en la entrada del gel separador. Corresponderían a polímeros de caseína, puesto que no se las observa en el primer esquema. Como resultado de someter las caseínas de esta especie al pasaje por Sephacryl S-200, se obtuvieron 3 picos principales. Cada uno de



**Figura 2:** SDS-PAGE: Caseínas de venado de las pampas.

Caseínas totales

1: c/ag. red

2: s/ag. red

Cromatografía de partición:

3: Pico I: s/ag. red

4: Pico I: c/ag. red

5: Pico II: s/ag. red

6: Pico II: c/ ag. red

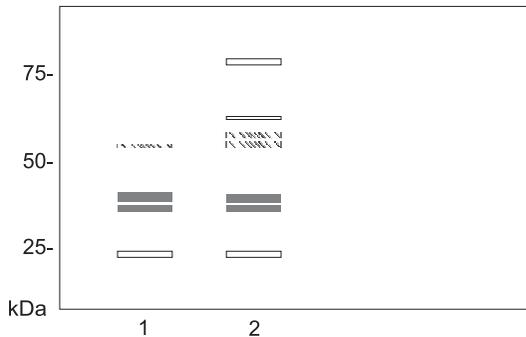
7: Pico III: c/ag. red

8: Pico III: s/ ag. red

los picos se sometió a electroforesis en las dos condiciones mencionadas y se constató que, la banda de los 200 kDa estaba constituida por moléculas de  $\kappa$ -caseína y  $\alpha_s$ -caseína, como así también una tenue banda de unos 15 kDa que no hicimos figurar en el esquema. Para el segundo pico del eluido aparece una sola banda de masa molecular cercana a los 60 kDa cuando no se utiliza el tratamiento reductor y de dos bandas 30 y 35 kDa cuando se reducen y que corresponderían a la  $\alpha_{s2}$ -caseína monomérica y la  $\kappa$ -caseína, respectivamente. En el tercer pico no se encuentran diferencias entre los dos tratamientos, se observan dos bandas principales de aproximadamente 30 kDa y 35 kDa. Seguramente se trata de la  $\beta$ -caseína, y la  $\alpha_{s1}$ -caseína, la primera de las cuales encubre a la  $\kappa$ -caseína. Estimamos que, en base al desplazamiento, la presencia de glúcidos y al cambio relativo de intensidad de las bandas, que la banda más rápida corresponde a una  $\beta$ -caseína, la de migración intermedia a la  $\alpha_{s2}$ -caseína, y que la tercera banda corresponde a la superposición de la  $\kappa$ -caseína con una  $\beta$ -caseína.

#### TAPIR (*Tapirus terrestris*)

En la Figura 3, se puede observar que en presencia de AR aparecen: a) las bandas monoméricas de las caseínas, dos en este caso de gran intensidad, b) una banda de peso molecular cercano a los 60 kDa, que corresponde a una proteína asociada a las micelas, y c) otra de 20 kDa, cuya naturaleza no hemos



**Figura 3:** SDS - PAGE: Caseínas de tapir.

Caseínas totales

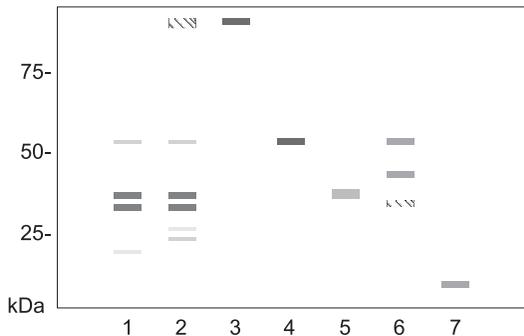
1: c/ ag.red.

2: s/ ag.red.

determinado. En ausencia de agentes reductores aparecen cuatro bandas adicionales, una de ellas superpuesta con la proteína asociada a las micelas, de entre los 50 y 70 kDa, las cuales consideramos que son caseínas unidas por puentes disulfuro, puesto que desaparecen con el tratamiento reductor. Estimamos que la banda más intensa corresponde a la  $\beta$ -caseína y las dos de menor intensidad corresponden a la  $\alpha_{s1}$ -caseína, la  $\kappa$ -caseína se superpone en parte con la banda mayor de  $\beta$ -caseína. Esta interpretación es coincidente con lo que ocurre en otros perisodóctilos (Iametti *et al.*, 1997; Egito *et al.*, 2002).

#### ELEFANTE MARINO (*Mirounga leonina*)

Los porcentajes de caseínas monoméricas es de un 90 %, un 8% corresponde a las poliméricas y un 2% a una proteína asociada de 60 kDa que se superpone en los geles S/ar con una de las bandas poliméricas. El análisis electroforético (Figura 4) de los eluidos de la cromatografía de partición mostró que la banda de mayor peso molecular, unos 150 kDa, es un oligómero que está constituido por proteínas de 60 kDa que coprecipitan con las caseínas. El resto de los picos de elución demostró la presencia de cinco bandas, dos de ellas coincidían con lo esperado para las bandas la  $\beta$ -caseína, y la  $\alpha_{s1}$ -caseína, otra corresponde a la ya mencionada



**Figura 4:** SDS - PAGE: Caseínas de elefante marino.  
 Caseínas totales: 1: c/ ag.red. 2: s/ ag.red.  
 Cromatografía de partición: 3: Pico I s/ ag.red. 4: Pico I c/ ag.red. 5: Pico II s/ ag.red. 6: Pico III s/ ag.red. 7: Pico IV s/ ag.red.

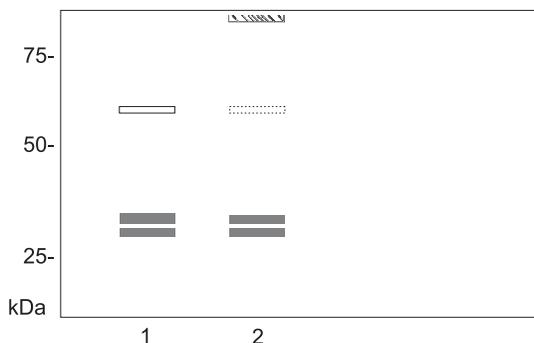
proteína de 60 kDa, una cuarta mostró una masa de 14 kDa y la restante de 30 kDa. Esta especie muestra una característica especial que es la presencia de la banda de 60 kDa.

#### LOBO MARINO (*Otaria flavescens*)

A diferencia de lo que ocurre con el otro mamífero marino estudiado, las caseínas de *Otaria flavescens* tienen una composición simple (Figura 5), dos bandas de monómeros, una banda de una proteína de unos 60 kDa que subsiste al tratamiento reductor, y un oligómero de unos 150 kDa que se divide en monómeros de  $\alpha_{s1}$ -caseína y  $\kappa$ -caseína en PAGE-SDS C/ar. Los resultados de la cuantificación del análisis densitométrico de geles S/ar mostraron que 96 % de caseína se encuentra en forma monomérica, un 2% corresponde a las poliméricas y alrededor del 2 % para la proteína asociada a las micelas de caseína.

#### ARMADILLO (*Chaetophractus vellerosus*)

Esta especie posee siete bandas (Figura 6) dos de las cuales desaparecen con el tratamiento reductor, de manera que: a) una corresponde a un oligómero de unas 150 kDa, y otra de entre 55 y 60 kDa que desaparecen en el tratamiento reductor; b) cuatro principales correspondientes a caseínas monoméricas, tres de estas bandas pesan alrededor entre 28 y 37 kDa, otra de algo más de 40 kDa; y c) una más liviana de unos 20 kDa, que es una proteína asociada a la micela. Salvo una de las bandas, la que

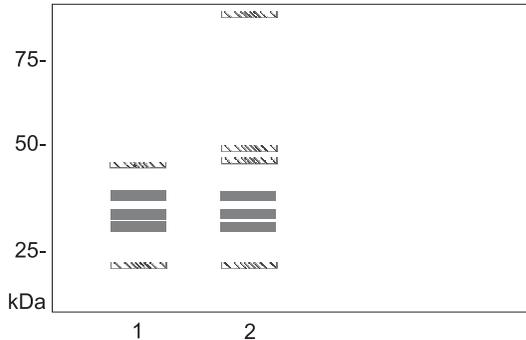


**Figura 5:** SDS-PAGE: Caseínas de lobo marino.

Caseínas totales

1: c/ ag.red.

2: s/ ag.red.

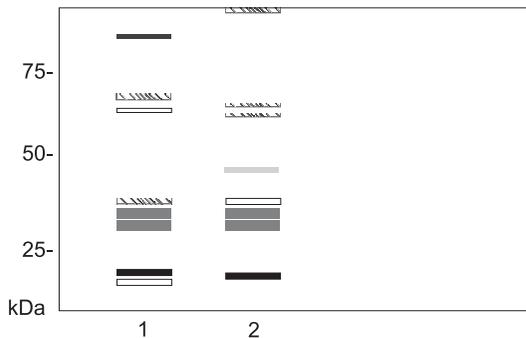


**Figura 6:** SDS-PAGE: Caseínas de armadillo.  
Caseínas totales  
1: c/ag.red  
2: s/ag.red.

corresponde a la  $\kappa$ -caseína, que se comporta como una proteína de unos 37 kDa, no pudimos identificar tentativamente a las otras bandas de caseína. De hecho, las caseínas de esta especie se comportan de forma distintas a las correspondientes a los otros mamíferos estudiados.

#### MONO CAÍ (*Cebus apella*)

Los análisis electroforéticos demostraron que posee ocho proteínas que constituyen la micela (Figura 7). Estas ocho proteínas



**Figura 7:** SDS- PAGE: Caseínas de mono caí.  
Caseínas totales  
1: c/ ag.red.  
2: s/ ag.red.

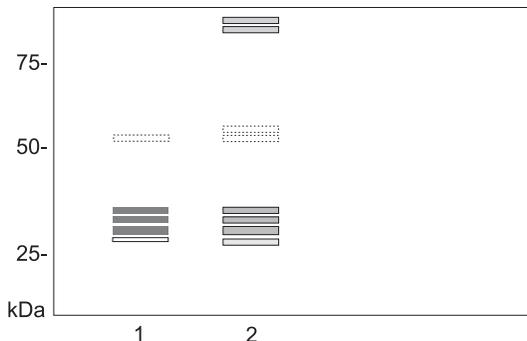
se distinguen porque: a) tres poseen masas moleculares y características que corresponden a las caseínas conocidas,  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -caseína, y  $\alpha_{s1}$ -caseína; b) una corresponde a un oligómeros mayor (200 kDa); c) otra es un dímero (45 kDa) en el cual uno de los componentes es la  $\kappa$ -caseína y el otro una proteína menor de unos 17 kDa; y d) tres son proteínas asociadas. Curiosamente parece que una de las proteínas no caseínicas forma parte del oligómero mayor mencionado, puesto que solamente aparece después del tratamiento reductor.

#### CIERVO EUROPEO (*Dama dama*)

En la Figura 8, se esquematiza la distribución de las caseínas. De las ocho bandas que se observan en los electroforesis S/ar, dos son muy tenues (58 y 60 kDa), y una de éstas es un dímero. De las seis restantes, las dos de mayor masa molecular (más de 100 kDa) son oligómeros que desaparecen en el tratamiento reductor. Las cuatro bandas restantes corresponden a la  $\beta$ -caseína,  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\kappa$ -caseínas y (probablemente) la  $\alpha_{s2}$ -caseína.

#### LLAMA (*Lama glama*)

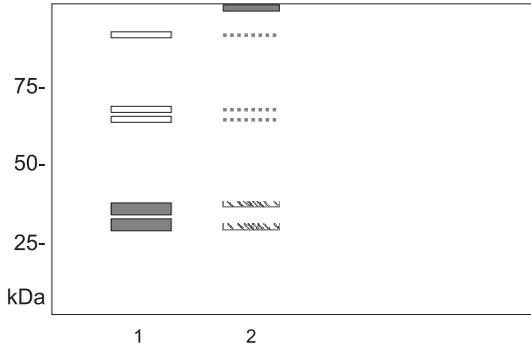
De las seis bandas principales presentes en las electroforesis S/ar, tres corresponden a proteínas asociadas a las moléculas, una corresponde a un oligómero de unos 200 kDa y las otras dos a monómeros de caseína (Figura 9). Cabe aclarar que cuando se llevan a cabo electroforesis con concentraciones mayores de pro-



**Figura 8:** SDS -PAGE: Caseínas de ciervo europeo.  
Caseínas totales

1: c/ ag.red.

2: s/ ag.red.



**Figura 9:** SDS -PAGE: Caseínas de llama.

Caseínas totales

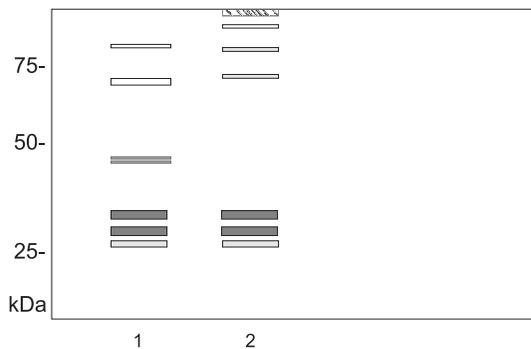
1: c/ ag.red.

2: s/ ag.red.

teína sembrada se pueden observar un par de bandas monoméricas adicionales.

#### ALPACA (*Lama pacos*)

Las características electroforéticas de sus caseínas (Figura 10) son muy parecidas a las correspondientes a la llama, tan solamente se debe mencionar que, en las condiciones en que se llevaron a cabo las PAGE, algunas de las bandas resuelven mejor



**Figura 10:** SDS-PAGE: Caseínas de alpaca.

Caseínas totales

1: c/ ag.red.

2: s/ ag.red.





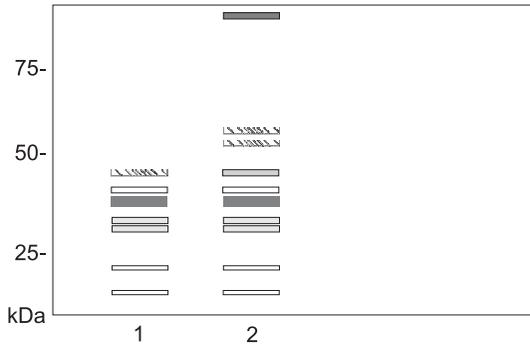
relación con otras variables, entre las cuales es importante el tiempo de lactación, detalles que no se muestran en este trabajo (M. Hernández de Sánchez y G. Silenzi, com.pers.).

La cuantificación arrojó los siguientes resultados: 49 % de las caseínas se encuentran en forma monomérica, el 13 % en forma de polímeros y las proteínas asociadas constituyen el 38 % del restante total de proteínas micelares. En la cromatografía de partición en Sephacryl S-200 eluyeron en tres picos principales, cada uno de los cuales fue sometido a electroforesis. En estos tres picos se distribuyeron los componentes de las micelas en orden a sus masas moleculares, las de más de 200 kDa, luego otra banda de 65 kDa, después una banda de 22 kDa, aproximadamente. Las bandas de 22, 65 y levemente una de las de 200 kDa se tiñeron con PAS indicando la participación de la  $\kappa$ -caseína. La participación de la  $\kappa$ -caseína y la  $\alpha_{s1}$ -caseína en la formación de oligómeros de caseínas ha sido registrada en parte de la descripción de la primera proteína por UniProKB/SwisProt en su base de datos: "Subunit: Heteromultimers composed of alpha-s1 casein and kappa casein linked by disulfide bonds".

Durante el transcurso de los experimentos con leche materna, observamos una proteína de características especiales que se presentaba tanto en el lactosuero como también asociada a las micelas. Las circunstancias en las que se presentaba en una u otra forma se discute más adelante. Se pudo aislar esta proteína a partir de su afinidad por las caseínas. Su caracterización demostró que es una fosfoglicoproteína de unos 70 kDa. A partir de ello consideramos que se trata de la osteopontina, cuya presencia en la leche humana ha sido mencionada.

#### OSO HORMIGUERO (*Myrmecophaga tridactyla*)

Las electroforesis S/ar mostraron diez bandas proteicas. De éstas, las más pesadas correspondían a oligómeros de 200, 60 y 55 kDa. Cuatro de las restantes pertenecían a monómeros de pesos entre 39 y 25 kDa, por una parte, y las otras tres (47, 22 y 19 kDa) a proteínas asociadas a las micelas. Se destaca en esta especie la intensidad de las bandas monoméricas. La banda de 47 kDa es común a todos los Edentados. Parte de este hallazgo constituye información sobre la cual no encontramos antecedentes en publicaciones periódicas. En la Figura 13, se presenta el esquema que contiene la información correspondiente a los dos geles anteriores. No estamos en condiciones de identificar las



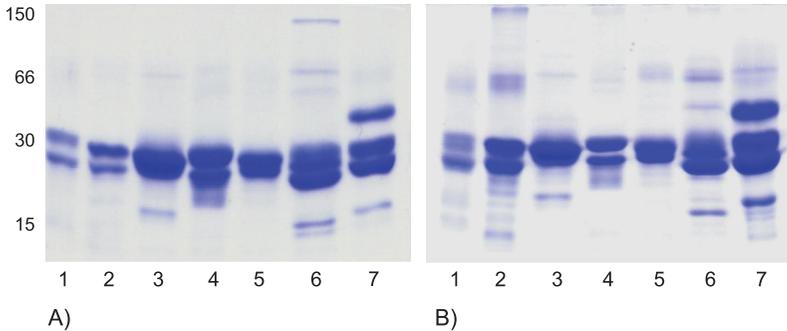
**Figura 13:** SDS-PAGE: Caseínas de oso hormiguero.  
Caseínas totales  
1: c/ ag.red.  
2: s/ ag.red.

distintas bandas, pero sabemos que la banda de 35 kDa corresponde a la  $\kappa$ -caseína.

#### PROTEÍNAS ASOCIADAS CON LAS MICELAS DE CASEÍNAS DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

En la Figura 14, se muestran dos electroforesis (C/ar y S/ar). Es notoria la desaparición de las bandas de los oligómeros debida a los agentes reductores. También se notan las bandas que subsisten a este tratamiento y que corresponden a las proteínas asociadas a las micelas. Estas son menos evidentes que los oligómeros pero son perfectamente cuantificables mediante el análisis densitométrico. En los geles con agentes reductores de las caseínas de todas las especies estudiadas aparecen bandas de proteínas cuyas masas moleculares son mayores o menores que los de las caseínas. En general estas proteínas, que forman parte de las micelas, son diferentes en las distintas especies. Pero se observa una influencia filogenética dado que existe cierta similitud entre especies relacionadas dentro del mismo Orden y más aún de la misma Familia. Tales son los casos de las especies que integran el grupo de los camélidos, de los quirquinchos (armadillos) y de los cérvidos.

Los pesos moleculares de estas proteínas asociadas tienen masas que varían entre 15 kDa y 150 kDa. Las más frecuentes,



**Figura 14:** Caseínas de la leche de varias especies de mamíferos.

A) SDS- PAGE con agentes reductores

B) SDS-PAGE sin agentes reductores

1: corzuela; 2: venado de las pampas; 3: tapir; 4: lobo marino; 5: elefante marino; 6: mono caí; 7: armadillo.

que se presentan en la mayoría de las especies, corresponden a masas que son algo menores a 20 kDa y mayores a 60 kDa. Las proteínas asociadas se encuentran en distintas concentraciones entre las diferentes especies y no guardan una relación de proporcionalidad con las concentraciones de caseína de cada especie. Por otra parte, todas tienen un cierto grado de hidrofobicidad, puesto que se separan de las caseínas en presencia del detergente dodecil-sulfato de sodio. Estas proteínas no forman enlaces covalentes (disulfuro) con otras proteínas. En algunas especies tales como en corzuela, venado de las pampas, tapir, yegua, lobo marino, armadillo, mono caí y humano, superan en concentración a los polímeros de caseína, cuyos monómeros se encuentran ligados por enlaces covalentes.

## EL PAPEL DE LA $\kappa$ -CASEÍNA

Los ensayos de western-blottings con anticuerpos anti  $\kappa$ -caseína bovina demostraron que en todas las bandas de alto peso molecular, en los geles sin agentes reductores, los anticuerpos reconocían moléculas de  $\kappa$ -caseína. Se pudo constatar que en todos los casos la  $\kappa$ -caseína entraba en la estructura de los oligómeros. En los geles con agentes reductores se pudo observar las  $\kappa$ -caseínas monoméricas de las diferentes especies formando una banda.

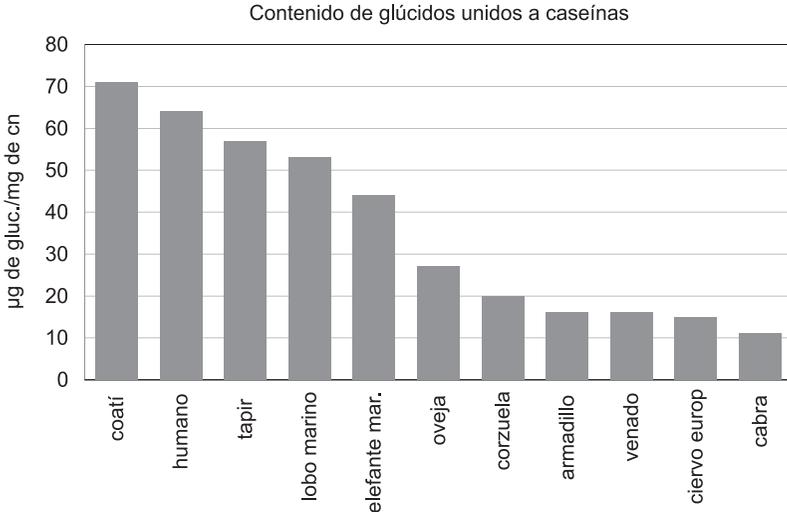
Por otra parte, nuestro grupo llevó a cabo ensayos sobre el contenido de carbohidratos de las caseínas en distintas especies de mamíferos. A este tema se hará referencia más adelante porque consideramos que aporta datos interesantes a los problemas del papel de la  $\kappa$ -caseína.

## LA SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN

Cuando los constituyentes de las micelas de caseínas son sometidos a cromatografía de filtración por gel en Sephacryl S-200 aparecen en los sucesivos tubos del eluido una serie de picos que varían en magnitud entre las especie analizadas. En general en todas las especies, los polímeros de caseína eluyen en el primer pico, lo cual es esperable debido a su mayor masa molecular. En los estudios electroforéticos posteriores, sin agentes reductores, realizados con estos eluidos aparecen una serie de bandas que van desde los  $\approx 50$  kDa hasta más de 200 kDa. Sin embargo, y como era previsible, cuando se realizan las electroforesis de los mismos picos en presencia de agentes reductores que rompen los puentes disulfuro, los monómeros resultantes migran formando las bandas del peso molecular menor correspondiente. En todos los casos aparece la  $\kappa$ -caseína monomérica como uno de los constituyentes de los oligómeros.

## GLICOSILACIÓN DE LAS CASEÍNAS DE LAS DIFERENTES ESPECIES

El contenido de glúcidos de las caseínas determinado por el método del orcinol sulfúrico mostró diferencias en el contenido de glúcidos de las caseínas de las distintas especies, lo cual se muestra en la Figura 15. Las caseínas de los artiodáctilos contienen los menores contenidos de glúcidos (16 mg de glúcidos/mg de caseína [ $\mu\text{g}/\text{mg Cn}$ ] para el venado de las pampas; 19,8  $\mu\text{g}/\text{mg Cn}$  para la corzuela y 11  $\mu\text{g}/\text{mg Cn}$  para la cabra). El grupo de los carnívoros presentó los valores de glúcidos más elevados: 44  $\mu\text{g}/\text{mg Cn}$ , para el lobo marino, 53  $\mu\text{g}/\text{mg Cn}$  para el elefante marino y 71  $\mu\text{g}/\text{mg Cn}$  para el coatí. Uno de los perisodáctilos estudiados, el tapir, también presentó un valor importante (57  $\mu\text{g}/\text{mg Cn}$ ).



**Figura 15:** Cantidad de glúcidos unidos a caseínas de once especies de mamíferos placentarios, expresadas en  $\mu\text{g}$  de glúcidos por mg de caseína.

En las electroforesis (SDS-PAGE, S/ar) con tinción de PAS se pudo observar que en las caseínas de corzuela, venado de las pampas, ciervo europeo y yegua, no aparecen bandas. Lo mismo ocurre con las proteínas asociadas a las micelas, las cuales tampoco pudieron evidenciarse por medio de esta tinción. En las muestras de tapir y oso hormiguero aparecen bandas notorias de glicoproteínas. En el tapir se pueden apreciar formas monoméricas y una proteína de alrededor de 60 kDa, que podría ser una proteína asociada a las micelas de caseína. En el caso del oso hormiguero, aparecen 4 bandas de polímeros glicosilados de aproximadamente 60 y 200 kDa y una banda de muy bajo peso molecular ( $\sim 6\text{-}10$  kDa).

Los casos más interesantes corresponden a los carnívoros. En SDS-PAGE sin agentes reductores con tinción de PAS las caseínas glicosiladas de coatí se presentan en forma de un polímero de alto peso molecular en el borde del gel separador. En la leche de perra hay, en cambio, cuatro bandas de caseínas glicosiladas, dos monoméricas (una de  $\approx 25$  kDa y otra de  $\approx 38$  kDa) de mayor intensidad y dos bandas poliméricas de  $\approx 60$  kDa y  $\approx 200$  kDa de menor intensidad de color. En cuanto a las glicoproteí-

nas de los dos mamíferos marinos estudiados se puede ver que hay diferencias entre ambas especies, con mayor número de bandas en el elefante marino que en el lobo marino. En el elefante marino aparece una banda de  $\approx 60$  kDa, que podría ser una proteína asociada y polímeros de peso molecular más elevado de aproximadamente 80 kDa. En el lobo marino solo se pueden ver bandas bastante tenues en la zona de los monómeros.

En la especie humana las proteínas asociadas a las micelas de caseína están fuertemente glicosiladas como pudo apreciarse por la intensidad de color.

Los resultados mostraron que en las muestras de caseína previamente reducidas a sus formas monoméricas y luego sometidas a la incubación con lactosuero se llevó a cabo la reconstitución de polímeros de caseína. De acuerdo a sus pesos moleculares ( $>$  de 50 kDa) se trata de dímeros y polímeros de alto peso molecular ( $>$  de 200 kDa), siendo estos últimos los más abundantes. Mediante el ensayo de western-blotting, con anticuerpos anti- $\kappa$ -caseína bovina, se determinó que el principal constituyente de estos polímeros es la  $\kappa$ -caseína.

#### ASPECTOS COMPARATIVOS DE LOS OLIGÓMEROS Y LAS PROTEÍNAS MICELARES ASOCIADAS

El cuadro encontrado en el estudio de las caseínas de catorce especies es heterogéneo y no siempre fue fácil de asignar las homologías. Éstas se establecieron en forma tentativa teniendo en cuenta los siguientes elementos:

- 1) La movilidad electroforética.
- 2) La detección mediante anticuerpos anti- $\kappa$ -caseína bovina los cuales han presentado reacción cruzada con las proteínas de, por lo menos, una de las distintas bandas de caseína presentes en las especies estudiadas.
- 3) La relación cuantitativa que guardan entre sí las caseínas de las distintas especies de mamíferos es variada, sobre todo entre las  $\alpha_s$  y  $\beta$ -caseínas.
- 4) El hecho que la  $\beta$ -caseína no forma puentes disulfuros, implica que no forma agregados como la  $\kappa$ -caseína y las dos  $\alpha_s$ -caseínas. O sea que las bandas correspondientes a la  $\beta$ -caseína no aumentaban su densidad relativa cuando se trataban los geles C/ar, lo que proporcionaba una pista confiable sobre su identidad.

En los perisodáctilos como yegua y burra también han sido estudiadas las principales caseínas. En la leche de yegua se pueden encontrar también los cuatro tipos de caseínas conocidos en la vaca (Iametti *et al.*, 1997; 2001; Egito *et al.*, 2002).

Hasta donde hemos podido comprobar, no existen datos en la bibliografía sobre las caseínas de las siguientes especies silvestres que han sido estudiadas en nuestros laboratorios: corzuela, venado de las pampas, ciervo europeo, tapir, mono caí, elefante marino, lobo marino, armadillos y oso hormiguero.

### COMPOSICIÓN DE OLIGÓMEROS DE CASEÍNA PRESENTES EN LAS DIFERENTES ESPECIES

Cuando las caseínas son sometidas a cromatografía de partición en presencia de urea se separan en todos sus componentes, a menos que estén unidos en forma covalente. En todas las muestras de las especies estudiadas en los primeros picos de elución eluyen los polímeros de caseína de mayor tamaño. Estos están formados por la unión, a través de puentes disulfuro ya sea de los monómeros entre sí, o puntualmente con otras proteínas.

Cuando se rompen estas uniones por medio de los agentes reductores, aparecen en las electroforesis, como bandas individuales y homomoleculares, las proteínas que las conforman. Estas proteínas integrantes de los polímeros son diferentes en las especies estudiadas. En la cabra, la  $\kappa$ -caseína se une por puentes disulfuro con la  $\alpha_{s2}$ -caseína y también consigo misma en una gradación de tamaños que va desde dímeros a decámeros. También se han encontrado uniones de este tipo con una proteína del lactosuero, la  $\alpha$ -lactalbúmina, por medio de la reorganización de las uniones S-S intracatenarias que pasan a ser intercatenarias formando dímeros u oligómeros heteromoleculares. Esto había sido estudiado solamente en la vaca donde se vió que la  $\alpha_{s2}$ -caseína puede existir en forma de dímeros y también puede formar oligómeros con la  $\kappa$ -caseína (Rasmussen y Petersen, 1991). Ello ocurre en forma similar al proceso de homo-oligomerización en el que la  $\kappa$ -caseína de la vaca puede formar polímeros consigo misma, desde dímeros a decámeros (Talbot y Waugh, 1970).

En la leche de cabra también existen oligómeros de caseína, tal como se comprobó en el presente trabajo. La disponibilidad de muestras de varias razas de esta especie dió la posibilidad de ex-

tender el estudio sobre ellas. Las razas estudiadas fueron: Saanen, Nubia y Criolla. Se encontraron, por lo menos, cinco bandas de oligómeros que según los pesos moleculares aparentes corresponderían a dímeros, trímeros y polímeros de mayor peso. Los más grandes de estos polímeros caían en los límites de la capacidad de discriminación de los métodos utilizados en este trabajo. Estos tipos de oligómeros se observaron en animales de las tres razas, aunque diferían en cuanto a la intensidad de cada banda.

El análisis de las intensidades de las bandas de polímeros demostró que había diferencias en los patrones correspondientes a los animales Criollos por una parte y a los de razas Saanen y Nubias por otra. En este sentido se pueden considerar dos hechos destacables. En primer lugar, se observó que los animales Criollos tenían mayor cantidad de caseínas en forma de polímeros con respecto a los animales de las otras razas (Tabla 4). En segundo lugar, se observó que entre los animales no Criollos la cantidad relativa de cada banda homóloga de oligómeros guardaba cierta constancia. En cambio, en los Criollos se pudo observar una notoria variabilidad. Dicho de otro modo, las intensidades de las bandas homólogas de oligómeros en Criollos variaban entre los distintos animales, teniendo una mayor dispersión en sus valores que los correspondientes a las otras razas. De los hechos que se destacan a partir de los resultados encontrados en el estudio de las diferentes razas de cabras, si bien algunos eran esperables, no habían sido demostrados hasta el momento, por ejemplo, la presencia de oligómeros de caseína en las tres razas estudiadas.

Otro resultado novedoso es el hecho que haya diferencias cuantitativas entre las razas. En este sentido, lo que más se destaca es que los animales Criollos tienen mayor cantidad relativa

	Nubias / Saanen		Criolla	
	Oligómeros	Monómeros	Oligómeros	Monómeros
% de Cn Tot.	12,25	87,75	17,05	82,95
STD % de Cn T	0,77		1,81	
Cn (g / L)	4,24	22,61	7,43	28,11

**Tabla 4.** Porcentajes que del total de las caseínas corresponden a los monómeros de éstas, y sus polímeros en la leche de dos grupos de cabras: Criollas vs. Saanen + Nubias.

de oligómeros y además presentan un cierto polimorfismo en su expresión cuantitativa. Probablemente, lo que estamos observando, la mayor cantidad de oligómeros en animales Criollos, está demostrando una ventaja biológica vinculada a una mayor capacidad de establecer uniones disulfuro intercatenarias.

El objetivo concreto de aquellos mecanismos que producen (o restauran) las uniones disulfuros entre las moléculas susceptibles, para el caso los monómeros de  $\kappa$ -caseína, por ejemplo, sería preservar la integridad de las moléculas cuya estructura depende de estas uniones —por ejemplo, de las inmunoglobulinas y las enzimas que participan en los mecanismos de defensa inespecíficos— a través de su mayor capacidad para restablecer los puentes disulfuro.

Por otro lado, se ha observado una mayor variabilidad en Criollos en lo que respecta a la cantidad de proteína en las distintas bandas de oligómeros, siendo probable que esta situación pueda estar reflejando polimorfismos de las caseínas (incluido el grado de glicosilación de la  $\kappa$ -caseína) lo que haría que la enzima sulfhidril-oxidasa tenga distinta afinidad frente a los distintos componentes de una “variedad” de substratos, produciendo en consecuencia, diferente cantidad de cada uno de los oligómeros de caseínas.

En el venado de las pampas, aparentemente no se forman polímeros con ninguna proteína del lactosuero. Además no hay gradación de tamaño de los mismos, sólo aparece una banda de muy alto peso molecular. Al descomponer los polímeros de la leche de esta especie ya sea por cromatografía o por SDS-PAGE con agentes reductores se puede observar por el peso molecular que hay una  $\alpha_s$ -caseína que forma parte de los polímeros mayores junto con la  $\kappa$ -caseína y también que esta misma caseína forma dímeros por autoasociación.

El Orden Carnívora tiene dos subórdenes que difieren en los patrones de composición de la leche: Fissipeda (terrestres) y Pinnipeda (marinos). Como se sabe, algunas de las diferencias entre ambos están dadas por el contenido de lípidos de la leche, que es mucho mayor en los marinos, y el contenido de azúcares lácteos que están en cantidades muy reducidas en estos últimos (Oftedal, 1984). En cuanto a las caseínas hemos observado que en los animales marinos estudiados (elefante marino y lobo marino), las bandas de las caseínas monoméricas tienen un peso molecular similar.

Por otra parte, en el perro, aparece una banda que migra mucho más rápido y que no se vió en los otros grupos. En la leche de perra esta banda se tiñe con la tinción de PAS, o sea que está glicosilada. Se sabe que una de las caseínas del perro ha sido secuenciada y se ha visto que tiene una secuencia de aminoácidos muy similar a la  $\alpha_{s1}$ -caseína de bovino (Jenness, 1982). A partir de los presentes resultados se evidencia que dicha proteína tiene la capacidad de formar puentes disulfuro, puesto que se presenta en forma monomérica, sólo después de romper los mismos. Las bandas correspondientes a los monómeros de los otros tipos de caseínas no participan en la formación de los polímeros.

En lo que respecta a los oligómeros, los tamaños son diferentes en las dos especies de mamíferos marinos estudiadas. Parte de estos oligómeros presentaron un peso molecular de aproximadamente el doble del correspondiente a los monómeros, lo que hace suponer que se trata de dímeros de caseína.

En los elefantes marinos, sólo se evidencian polímeros de muy alto peso molecular, que cuando son descompuestos por los agentes reductores se resuelven en una banda de un peso molecular alto (aproximadamente de 60 kDa). El hallazgo de esta proteína es otro hecho novedoso pues no hemos encontrado en la bibliografía ninguna referencia a una proteína de este peso que coprecipite con las caseínas y que forme polímeros reducibles por agentes de tipo ME y DTT. Al respecto, cabe hipotetizar sobre la existencia de una caseína de peso molecular mayor al resto de las caseínas conocidas.

En las muestras de micelas de caseína humana, se observó una banda de proteína de  $\approx 70$  kDa, que no desapareció después del tratamiento con agentes reductores y que se evidencia como glicosilada por su reacción con tinción de PAS. Estos dos hechos nos llevaron a pensar que probablemente se trataría de una glicofosfoproteína descrita por Azuma y Yamauchi (1987), quienes la denominaron fosfoproteína altamente glicosilada (HGPP) y que posteriormente fue identificada como la osteopontina. Esta proteína, como ya fue expuesto, fue aislada del lactosuero. Para ello, se realizaron pruebas con varios tratamientos: NaCl, EDTA y detergentes no iónicos como el tritón X-100. El método que dio mejor resultado fue la cromatografía de partición utilizando urea y SDS, con el cual se pudo separar esta glicoproteína del resto de las caseínas. De esta manera, se pudo deducir que esta proteína está

unida a la caseína por uniones electrostáticas y hidrofóbicas que son eliminadas por la urea. En trabajos posteriores de los mismos autores (Azuma *et al.*, 2006), se ha propuesto que esta proteína —la *osteopontina*— previene la interacción del calcio y el fosfato en las micelas de caseína impidiendo la formación de cristales.

En cuanto a los oligómeros en las caseínas humanas, hemos comprobado que corresponden mayoritariamente a polímeros de alto peso molecular de  $\kappa$ -caseína. No se descarta que también formen oligómeros con otra caseína para el caso la  $\alpha_{s1}$  caseína.

En el mono caí, también aparecen proteínas de un peso molecular similar a la *osteopontina* asociadas con las caseínas. En este primate, se encontró por otra parte una proteína de 15 kDa asociada a las micelas de caseína. La leche de los primates tiende a tener pocos sólidos. Una gran proporción de la materia seca de la leche está compuesta por azúcar (> 50%) mientras que las proteínas representan menos de 1/6 (17%) de la energía de la leche.

Hay consenso en el sentido que los bajos niveles de proteína pueden estar asociados con tasas bajas de crecimiento de la cría. Existen algunos datos que sugieren que la leche de los primates más pequeños es más concentrada (Oftedal, 1984). En el presente trabajo, se observó que en la leche de mono caí aparece un mayor número de bandas de caseína que en la leche humana, concretamente dos bandas que por su peso molecular podríamos sospechar que se trata de  $\alpha$ -caseínas.

No se pudo determinar la concentración de proteínas de la misma debido a lo exiguo del volumen de muestra obtenida. A pesar de esta limitación que reconocemos que no es un tema menor, es posible suponer que un mayor número de bandas de caseína se traduzca en una mayor concentración de  $\alpha_{s1}$  en la leche de este primate, con respecto a la leche humana. Dicho de otro modo, al ser mayor la concentración de  $\alpha_{s1}$ -caseína, esta se hace visible como banda o bandas en los geles teñidos para proteínas, que no es lo mismo que sucede en la leche humana en la cual la concentración de esta caseína es tan pequeña que es poco notoria en las electroforesis.

En las caseínas de este mono del nuevo mundo aparece una forma de peso molecular que correspondería a una forma dimérica o a una combinación de  $\kappa$ -caseína con otra caseína tipo  $\alpha_s$ -caseína. No se han encontrado bandas correspondientes a oligómeros que contengan proteínas del lactosuero en ninguno de los dos primates estudiados.

Aún no ha sido totalmente establecido el mecanismo de formación de los oligómeros y, relacionado con ello, tampoco el hecho que existiera una selección especial de las proteínas que los conforman. A juzgar por los datos de la literatura, probablemente las uniones heteroméricas que establece la  $\kappa$ -caseína no constituirían una función imprescindible para la estabilidad de las micelas. Probablemente no estén implicadas en el mantenimiento de la estabilidad de las mismas y, el hecho que presenten diferentes tamaños y composición proteica, en las distintas especies, no tenga relación con algún aspecto de esta función.

Existe la posibilidad que la existencia de oligómeros sea un subproducto de la actividad de mantenimiento de las estructuras proteicas. Esta última suposición implica que el objetivo real de la función está dirigido a mantener la estructura de otras proteínas importantes para la homeostasis de la propia leche.

#### ACTIVIDAD PROTECTORA DE ESTRUCTURAS PROTEICAS PRESENTES EN EL LACTOSUERO

Las proteínas lácteas muestran, en lo que se refiere a la integridad de los enlaces disulfuro, una adecuada y esperable conservación de sus estructuras durante la secreción y almacenamiento en los alvéolos. Ello es necesario sobre todo en aquellas proteínas y péptidos que tienen funciones de defensa antimicrobiana en la propia leche. Se sabe que existen por lo menos dos enzimas a las que se les ha atribuido esta función al actuar oxidando los restos sulfhidrilos que pudieron haberse originado por efecto de otras enzimas o componentes reductores. Ello fue mencionado al señalar el hallazgo de una sulfhidril oxidasa dependiente de flavina.

La existencia de oligómeros debida a uniones sulfhidrilos entre moléculas de  $\kappa$ -caseína y otras proteínas, puede explicarse por el hecho de que en la leche hay considerable actividad de la enzima (Janolino y Swaisgood, 1975; Pepper y Farrell, 1982; Hamosh, 1995; Hernández *et al.*, 2001). Si bien se ha medido la actividad de esta enzima en la leche bovina (Janolino y Swaisgood, 1975; Swaisgood y Horton, 1987), no hay información concreta sobre el alcance de la posible actividad restauradora de los puentes disulfuro sobre las proteínas de la leche de mamíferos.

Respecto a la naturaleza y características de la sulfhidril-oxida-

sa que está presente en la leche bovina, recientemente se ha identificado otra enzima con las mismas especificidades pero con distintas características (Jaje *et al.*, 2007). La nueva enzima, a diferencia de la identificada y caracterizada por Janolino y Swaisgood (1975; Swaisgood y Horton, 1987) es insensible al EDTA, no tiene hierro en su molécula y tiene una masa molecular distinta. Las observaciones sobre esta enzima muestran que es dependiente de flavina y que sería responsable de la mayor parte de la actividad sulfhidrilo-oxidante presente en la leche de vaca.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que en las muestras de caseínas monoméricas sometidas a incubación con lactosuero se llevó a cabo la restauración de los puentes disulfuro y la formación de polímeros de caseína. Ello significa que en el lactosuero estaría presente un factor o enzima capaz de restituir estos puentes con el propósito de restaurar estructuras proteicas para que sigan llevando a cabo su función biológica en forma correcta. La termolabilidad de la actividad encontrada en nuestros ensayos concuerda con que ella depende de la presencia de una enzima.

Por otra parte, el hecho que la inclusión de NAD en nuestros ensayos haya cambiado el comportamiento de la actividad de la SOX tornándola más lenta, lineal y sostenida implica que el aceptor de electrones interactuara con el sistema de la SOX. Todo ello constituye un apoyo adicional a la hipótesis de la restauración enzimática de las uniones intercatenarias.

## GLICOSILACIÓN DE LAS CASEÍNAS Y PROTEÍNAS ASOCIADAS A LAS MICELAS

Desde hace varios años se han publicado trabajos en los cuales se menciona el contenido de carbohidratos totales unidos a caseínas en la leche de varias especies (ballena, reno, vaca, cabra, oveja, caballo y humano) (Johansson y Svennhorlm, 1956). Por otra parte, también es conocido que los restos glicosídicos están unidos a la  $\kappa$ -caseína. En la leche de vaca se ha observado que hay variaciones en el grado de glicosilación de esta caseína y también que estas variaciones tienen relación con factores de orden genético y con el estado de lactación de los animales (Robitaille *et al.*, 1991).

El grado de glicosilación parece influir en esta capacidad es-

tabilizante. En este sentido Groves *et al.*, (1999) sostienen que la habilidad estabilizante aumenta con el aumento de los carbohidratos que contiene la  $\kappa$ -caseína. Lo que no parece influir sobre el efecto estabilizante es el tipo de carbohidrato que está asociado a la  $\kappa$ -caseína, puesto que se ha visto que hay variaciones entre las distintas especies en este aspecto. Así como se mencionó en la introducción hay diferentes tipos de ácido siálico en las distintas especies (Brinkman-Van der Linden *et al.*, 2000; Brody, 2000; Moreno *et al.*, 2000).

También existen distintas interpretaciones sobre la forma que se establece el papel protector de la estabilidad que le corresponde a la  $\kappa$ -caseína. Estas interpretaciones cubren todo un espectro. En un extremo, se encuentran aquellas que sostienen que las moléculas de  $\kappa$ -caseína tienen diferente disposición en las micelas de acuerdo al grado de glicosilación, y que la mayor proporción de  $\kappa$ -caseína glicosilada se encuentra en las micelas más grandes y en el interior de las mismas. En otro punto, se hallan los modelos propuestos con posterioridad que sostienen lo contrario; es decir, que la mayor proporción de  $\kappa$ -caseína glicosilada se encuentra en la superficie de la micela, formando polímeros de diversos tamaños (Dagleish, 1998; Holt, 1998; Sood y Slattery, 2001; Phadungath, 2005; Bouguyon *et al.*, 2006).

En el estudio de la glicosilación de las micelas de caseínas que hemos llevado a cabo, los resultados, correspondientes a la relación glúcidos/caseínas que se muestran en la Figura 15, pusieron de manifiesto una gradación de valores bastante amplios, desde caseínas con muy poca glicosilación, hasta aquellas con alto contenido de carbohidratos. Los resultados de casos en los que los glúcidos unidos a las caseínas no se observaban en la tinción específica, resultaron corroborados por los métodos colorimétricos paralelos.

El análisis del contenido de glúcidos en las formas poliméricas brindó interesantes resultados. En los mamíferos marinos, hemos visto que, con tinciones específicas para glúcidos, aparecen polímeros con masas moleculares diferentes a los detectados con Coomassie Blue: en las tinciones de PAS aparece una banda muy notoria de aproximadamente 80 kDa que no se observa en los geles en las mismas condiciones nativas teñidos con el colorante para proteínas. Ello puede originarse en el hecho que las moléculas de  $\kappa$ -caseína forman polímeros de diferentes dimensiones. Algunos de los cuales están constituidos por molécu-

las de  $\kappa$ -caseína y de otras caseínas, lo cual en conjunto, si bien se detectan por la Coomassie Blue, tiene bajo contenido de carbohidratos. Otros, en cambio, estarían formados muy probablemente, con moléculas de caseína muy glicosilada, lo cual habría dificultado la tinción por el colorante mencionado, pero es detectado por el PAS.

No descartamos tampoco que la banda de 80 kDa pudiera ser oligómero de una proteína no caseínica altamente glicosilada que coprecipita con las caseínas. En este sentido, también es importante mencionar que en varios casos (en las distintas especies), se ha podido detectar claramente que las proteínas asociadas a las micelas de caseínas poseen distintos grados de glicosilación.

Salvo el caso de la yegua y la burra hay relativamente pocos datos en la literatura acerca de la leche de los perisodáctilos. Los equinos y rinocerontes estudiados secretan leche que es relativamente pobre en materia seca, siendo el componente principal el grupo de los hidratos de carbono. Existen determinaciones llevadas a cabo por nuestro grupo de trabajo en el tapir, que sugieren en esta especie un mayor nivel de lípidos y menos azúcares que los correspondientes a las otras especies antes mencionadas.

En el tapir, se puede observar que con la tinción para proteínas aparece una serie de bandas correspondientes a los oligómeros, mientras que con la tinción para glicoproteínas sólo aparecen dos bandas: una de alto peso que coincide con una proteína asociada a las micelas de caseína y una banda monomérica de menor peso. No pueden detectarse con esta tinción las formas poliméricas que son muy visibles con la tinción para proteínas.

En el oso hormiguero por su parte, las bandas poliméricas sí pueden evidenciarse con la tinción de PAS, no así la proteína de 20 kDa asociada a las micelas.

En cuanto a los análisis llevados a cabo en la leche de coatí, se observó la falta de bandas correspondientes a caseínas monoméricas. Ello es explicable porque la muestra analizada correspondía a un animal que había entrado en período de secado, por lo cual probablemente las caseínas monoméricas no aparecen debido a la acción proteolítica de enzimas como la plasmina que actúa degradándolas. Es probable que solamente subsistieran los polímeros con alto contenido de glúcidos, que son los más resistentes al ataque de las proteasas.

En las especies domésticas, la bibliografía brinda bastante in-

formación sobre glúcidos que se encuentran unidos a las caseínas. Se le ha atribuido una serie de funciones biológicas al caseínomacropéptido, que parece ser el sector más activo en lo que se refiere a efectos biológicos adicionales a los conocidos. Entre estas funciones podemos citar: la supresión de las secreciones gástricas, la disminución de la agregación plaquetaria, la inhibición de virus y de toxinas bacterianas, como también inhibición de la adhesión de una serie de bacterias patógenas a la mucosa oral y dientes (Brody, 2000; Clare y Swaisgood, 2000; Vacca Smith y Bowen, 2000; Malkoski *et al.*, 2001).

Respecto a las especies silvestres que se han estudiado en nuestros trabajos, no hemos encontrado en la literatura información similar a la antes citada. Pero, por extensión, basándonos en los datos conocidos de las especies domésticas, consideramos que en las especies silvestres debe ocurrir algo similar aun cuando su expresión tenga una mayor heterogeneidad interespecífica.

A partir de la información sobre el grado de glicosilación de las caseínas se desprenden varias consideraciones. Por una parte, puede considerarse que habría una relación inversa entre el grado de glicosilación de las caseínas y el tamaño de las micelas. También puede suponerse que el tamaño de las micelas fuera proporcional a la cantidad de  $\kappa$ -caseína o que la situación correspondiera a una mezcla de las dos situaciones. A partir de nuestros resultados en las diferentes especies, consideramos que hay lugar para pensar que la cantidad relativa de  $\kappa$ -caseína varía entre diferentes especies, aun cuando no hemos podido efectuar la cuantificación de la  $\kappa$ -caseína en todas las muestras.

No es inverosímil pensar que la distinta cantidad de carbohidratos unidos a las caseínas pudiera representar una forma de contrabalancear una mayor tendencia a precipitar que tengan las caseínas de algunas especies. En este sentido, es necesario mencionar que existen diferencias entre especies en lo relacionado con la precipitación con cantidad crecientes de calcio iónico. En cualesquiera de los casos es pertinente afirmar que en aquellas especies en las cuales se han registrado valores elevados de glúcidos unidos a las caseínas, a sus polímeros o a las proteínas asociadas a las micelas de caseína, es probable que las funciones biológicas accesorias (defensa contra microorganismos, por ejemplo) atribuidas a estas características también deben estar presentes y constituyen una de las ventajas adaptativas y funcionales que han favorecido la subsistencia de cada especie.

## CASEÍNAS MONOMÉRICAS DE LAS DISTINTAS ESPECIES

A pesar de que la composición proteica de la leche puede diferir cuantitativamente de una especie a otra, todas las especies estudiadas hasta el nivel de RNAm contienen  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína. La comparación de las secuencias de ADN complementario de diferentes especies de mamíferos ha demostrado que las caseínas constituyen un par de familias de proteínas que presentan mayor variación, y, en consecuencia, que evolucionan más rápidamente en los sectores de la secuencia no comprometidos con la fosforilación (en el caso de las caseínas  $\beta$  y  $\alpha_{s1}$ ) o con la glicosilación y la susceptibilidad a la proteólisis por quimosina, en el caso de la  $\kappa$ -caseína.

Se ha visto que hay variación en el número de bandas y de los pesos moleculares en las diferentes especies, algunas de las cuales presentan bandas adicionales a las conocidas caseínas de los bovinos. En general, estas diferencias en los pesos moleculares pueden ser atribuidas a la presencia de variantes genéticas de los distintos tipos y/o diferencias en el grado de glicosilación o de fosforilación de las mismas.

Nosotros hemos encontrado varios casos que merecen ser mencionados: Las dos especies de quirquinchos (armadillos) presentan cuatro bandas de caseínas principales, de las cuales dos coinciden en masa molecular con las  $\alpha$  y  $\beta$ -caseína y las otras dos son más pesada y más liviana respectivamente. En cambio, las caseínas principales del oso hormiguero son cinco, tres de las cuales son más pesadas que las  $\alpha$ -caseínas y dos más livianas que la  $\beta$ -caseína.

El mono caí presenta tres bandas mayores bien definidas, una de las cuales tiene un peso molecular similar a las  $\alpha_s$ -caseínas. Ello hace suponer que esta caseína pudiera encontrarse en esta especie en mayor concentración que en el ser humano. En cuanto a los carnívoros, en las dos especies marinas (elefante marino y lobo marino), las bandas de caseínas monoméricas son similares en cuanto a la masa molecular y a la concentración proteica relativa de las bandas.

Las caseínas de tres especies de Edentados analizadas en nuestros laboratorios presentan un desafío para la interpretación. Los dos armadillos *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus* siguen un patrón que corresponden a tres proteínas mayores,

de unos 30, 33 y 40 kDa, que son claramente constitutivas y probablemente representan a las tres caseínas calcio-sensibles. En *Myrmecophaga tridáctila*, el patrón se parece pero la banda de menor masa molecular está desdoblada en dos bandas de menor intensidad, de manera que la suma de ésta equivale a la de 30 kDa de los armadillos. Con la banda de 40 kDa pasa algo parecido pues está desdoblada en dos menores cuya suma se asemeja a la de los *Chaetophractus*. Por otra parte, estos animales presentan una serie de bandas escalonadas de menor masa molecular, que podrían ser atribuibles a la acción de la plasmina sobre la  $\beta$ -caseína, como ocurre en los bovinos, pero en el caso de los edentados sigue un patrón bastante distinto puesto que la más pesada parece ser una proteína constitutiva *per se*.

Las variaciones observadas en el resto de las especies estudiadas en este trabajo, aceptan explicaciones que se basan en modificaciones postraduccionales, ya sea por glicosilación o fosforilación diferencial de la(s) molécula(s) de caseína.

### PROTEÍNAS ASOCIADAS A LAS MICELAS DE CASEÍNA

Todo lo mencionado en esta sección sobre las proteínas asociadas a las micelas de caseína es compatible con un patrón estructural en el cual estas proteínas jugarían un rol adicional en el mantenimiento de la solubilidad (dispersión) de las micelas de caseína. De hecho, la estructura de las micelas constituye un armazón de tamaño variable, con una distribución de volúmenes que suele ser algo diferente para cada especie. Los diferentes modelos de la estructura de las micelas coinciden en postular la existencia de sitios hidrofóbicos, ya sea que estén expuestos o no, los cuales pueden ser accesibles a diferentes tipos de péptidos y proteínas desde el lactosuero.

A juzgar por los pesos moleculares que poseen las proteínas asociadas a las micelas, se llega a la conclusión que, salvo una proteína de 60 kDa que se encuentra en varias especies (pero de la cual no sabemos que sea la misma en las especies portadoras), cada especie mamífera tiene distintos tipos de proteínas asociadas en su micela. Consideramos que una de explicaciones para esta situación muy probablemente se base en una heterogeneidad que encuentra su fundamento en las siguientes causas: a) las caseínas

son proteínas con una tasa alta de mutación (por las razones que mencionaremos más adelante), salvo en las regiones que tienen funciones específicas, como son las correspondientes a aminoácidos que serán fosforilados o glicosilados, o zonas que se encuentran al principio al final de la secuencia o las susceptibles a una acción por proteasas, como ocurre en la  $\kappa$ -caseína; b) en comparación con la mayor parte de las proteínas de la economía, las caseínas son muy hidrofóbicas, lo cual unido al hecho que existen regiones hidrofóbicas y regiones hidrofílicas, le confieren a estas proteínas un cierto carácter anfipático, el cual es notorio en el caso de la  $\kappa$ -caseína; c) las caseínas son proteínas altamente desordenadas con pocas  $\alpha$ -hélices y láminas  $\beta$ , o sea poco plegadas; d) estas proteínas tienen funciones principalmente nutricionales; e) al no llevar a cabo estas caseínas ninguna función de reconocimiento que sea vital para la madre o la cría, las secuencias de los sectores desordenados de las moléculas tienen una variabilidad muy grande, lo cual también se corrobora con la comparación interespecífica de las secuencias; f) al ser distintas (entre distintas especies) estas zonas, que constituyen sectores potenciales de unión a zonas (regiones o dominios) de proteínas del lactosuero, ello conlleva la posibilidad que también sean distintas las proteínas no caseínicas que se unan a estos sectores de las caseínas. A esta variabilidad en la capacidad de unión se puede atribuir la heterogeneidad observada en las proteínas asociadas a las micelas.

Se puede pensar que los espacios determinados por los polímeros de caseína que quedan en la superficie de las micelas constituirían la ruta de acceso para dichas proteínas y péptidos. Por lo tanto, cabe la posibilidad cierta de que aquellos sitios hidrofóbicos sean los lugares a los cuales pueden unirse regiones hidrofóbicas presentes en las proteínas asociadas a las micelas. Esta circunstancia probablemente contribuiría a aumentar la capacidad de suspensión de las micelas.

Los trabajos en que se publicaron la mayor parte de los datos, o el trabajo de Tesis completo que incluye una descripción de los aspectos metodológicos y resultados que no se muestran en esta revisión puede conseguirse escribiendo a la Dra. Marcela Hernández a la dirección que se incluye más adelante.

— Sexta parte —

## Las variaciones en las caseínas

---

por Graciela Ruiz de Bigliardo

### EL PROCESO DE SECRECIÓN DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS

El mecanismo celular de la secreción en el alvéolo mamario es similar a varios otros procesos de secreción con los cuales guarda gran paralelismo. Sin embargo, existen algunos detalles que conviene mencionar. En cuanto a las estructuras sucesivamente involucradas, el proceso comprende las siguientes etapas:

a) síntesis por los ribosomas en el retículo endoplasmático (RE) rugoso, donde asimismo se efectúa parte de la N-glicosilación de algunas de las proteínas,

b) luego se cumple el pasaje al aparato de Golgi donde se fosforilan las caseínas, se empiezan a formar las micelas y se termina de llevar a cabo la glicosilación iniciada anteriormente,

c) a continuación, se forman las vesículas secretorias que contienen las micelas,

d) las cuales son translocadas hacia el lumen alveolar (Burgoyne y Duncan, 1998).

Debe enfatizarse que la síntesis de lactoproteínas se lleva cabo en forma prácticamente simultánea de manera que las principales lactoproteínas, caseínas y del lactosuero, van siendo formadas, contenidas en los mismos túbulos y vesículas y recorriendo el camino que las lleva a las vesículas secretorias que serán exocitadas. Una de las consecuencias de esta simultaneidad y de esta co-localización es el hecho que la  $\alpha$ -lactalbúmina y la galactosil-transferasa promueven a la formación de lactosa ya mu-

cho antes de penetrar en el lumen alveolar. Esta lactosa atrae agua osmóticamente hacia las vesículas impidiendo la eventual compactación de las proteínas.

La secreción de las caseínas en lo que corresponde a la última fase, cual es la exocitosis de las vesículas que contienen las micelas de caseína, es continua en el sentido que no se cumple en ciclos, ni en tandas, sino que se produce en forma que es prolongación de la síntesis por parte de la célula. Esto es posible porque no existe almacenamiento intracelular de las proteínas lácteas.

Además de los concurrentes mecanismos de regulación, este proceso depende de la presencia de una adecuada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Relacionado con ello se encuentra el hecho que cuando se produce una depleción de calcio en el retículo endoplásmico, se reduce la síntesis de caseínas (Duncan y Burgoyne, 1996).

#### ACERCA DE LA VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA DE LAS CASEÍNAS

Las variaciones en las cuales se presentan las proteínas de una especie pueden ser objeto de varios tipos de clasificaciones, pero atendiendo a los aspectos genéticos que nos ocupan, podemos agruparlas en *constitutivas*, que responden a lo especificado en la secuencia nucleotídica del RNAm maduro, o *postraduccionales*, que corresponde a la estructura final de la proteína, y que incluye los cambios producidos por fosforilación, glicosilación o hidrólisis peptídica. Por tradición y rigor, los estudios genéticos ponen la mayor atención en las diferencias existentes entre los alelos de las proteínas que presentan polimorfismo en su expresión.

A lo anterior se debe agregar un aspecto que seguramente implica un fenómeno (históricamente) transitorio y que introduce, para los no iniciados en este campo, una cierta imprecisión en la evaluación de la variabilidad, como es el alcance del concepto de *alelo*. Hasta hace un par de décadas, el término *alelo* tenía un origen (y un sentido) claramente fenotípico y, tratándose de moléculas se reconocía como tal a las variantes genéticas de las proteínas. Con la aparición de las técnicas de análisis de DNA, y de la detección de variabilidad en los nucleótidos de la porción codificante (gracias a la generación de cDNA), de los

intrones y de las regiones no-traducidas pero promotoras, el concepto de alelo se ha extendido hasta abarcar a las sustituciones de un nucleótido en un gen (englobando los sinónimos codificantes). Incluso el término se está utilizando para identificar regiones o sectores del gen generados por enzimas de restricción.

Todo lo mencionado está produciendo la generación de gran cantidad de información y esta situación influye sobre la nomenclatura de las variaciones las que, en algunos casos cuantitativamente escasos, colisionan entre sí. Por ejemplo, la lista de los nombres de las variantes genéticas de alelos de lactoproteínas ya casi no es superponible con la nomenclatura de las variantes genéticas que se están observando con las técnicas más avanzadas.

Los primeros avances sobre polimorfismos en las proteínas lácteas se llevaron a cabo mediante la utilización de las técnicas de electroforesis, lo cual se remonta a las variables que presentaba la  $\beta$ -lactoglobulina en la leche de bovinos que observaron Aschaffenburg y Drewry (1953). Si bien estas técnicas siguen proporcionando sus frutos —y para observar algunas características de las proteínas son casi insustituibles— los modernos procedimientos de la genética molecular han introducido herramientas valiosísimas las que, a través del análisis directo de las secuencias de DNA y RNA, o del uso de la ingeniería genética están desentrañando aspectos extraordinariamente complejos de la estructura y del funcionamiento de estos genes.

Consideramos que la descripción de las variaciones de los genes que codifican las caseínas obliga a efectuar algunas consideraciones sobre conceptos generalmente aceptados, en relación a este objeto de estudio. Los conceptos de gen y de fenotipo son particularmente interesantes en este contexto. Para el caso de las proteínas lácteas, y debido a su inseparable relación con las características que determinan su aplicación práctica, en algunos casos, se ha extendido el concepto de fenotipo hasta englobar algunas de estas características. En este sentido, sería aconsejable restringir el concepto de *fenotipo* a las variantes genéticas de las proteínas, evitando su utilización para denominar las cualidades tecnológicas de los productos resultantes. De la lectura de algunos trabajos de revistas internacionales se evidencia la necesidad de homogenizar la terminología para evitar una excesiva polisemia.

En lo que sigue haremos mención de las principales variaciones que se han encontrado en las caseínas. Cuando decimos *se han encontrado* estamos haciendo referencia a un aspecto histórico

que tuvo, y tiene, una fuerte influencia en nuestro conocimiento del tema. Hemos evitado hacer una descripción exhaustiva de los genes y las variantes, pero hemos decidido poner a disposición de los lectores una lista de trabajos en los que se describen numerosos aspectos clásicos y otros heterodoxos de las variaciones de las caseínas. Esta bibliografía adicional se puede solicitar a la siguiente dirección de mail: [actazoologica@lillo.org.ar](mailto:actazoologica@lillo.org.ar).

Las consideraciones que siguen respecto a la información existente en la bibliografía son simplemente descriptivas y no implican juicios de valor. En este momento, el 98% del conocimiento existente sobre los polimorfismos de las caseínas y que se ha generado desde hace 10 años se basa en la información concerniente a las siguientes especies: *Capra hircus*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, y los dos roedores la laboratorio, de los géneros *Mus* y *Rattus*. Si a ello se agrega la información sobre nuestra especie y el conejo, se cubre más de un 99%. Lo mencionado se desprende fácilmente de las estadísticas que se pueden efectuar a partir de las búsquedas por Internet.

Como se ve, de estas seis especies cuatro son domesticadas y los dos roedores corresponden a líneas, cepas o poblaciones que tienen particularidades tales que, por su fuerte asociación con los trabajos experimentales, difícilmente podamos afirmar que son idénticos a las poblaciones salvajes o silvestres. La situación actual es tal que todos los animales que se utilizan forman parte de linajes perfectamente identificables, lo cual es recomendable que así sea en beneficio de una mayor rigurosidad en los protocolos experimentales. Por otra parte, la ciencia no habría podido avanzar si ello no fuera así, y el hecho de la identificabilidad, o la igualdad (o casi igualdad) genética de los individuos de algunas de las cepas no es un problema.

Sin embargo, puede significar un problema desde otro punto de vista en las otras especies mencionadas, puesto que la domesticación ha producido algunas consecuencias en la estructura génica que hace necesario ser cuidadoso al momento de extrapolar las conclusiones hacia el resto de los mamíferos. Frente a una pregunta que surge sobre si del estudio de los mecanismos descriptos encontrados en las especies mencionadas podemos inferir que la evolución funciona de manera similar, creemos que debemos contestar lo siguiente. Los mecanismos evolutivos que observamos es el producto de la evolución dirigida por la selección que nuestra especie humana ha impuesto a las otras especies.

Hay que reconocer que la cuestión es casi sin sentido desde un punto de vista pragmático, y parece ser puramente teórica. A pesar de ello, podemos mencionar una información interesante que, en cierta forma, relaciona polimorfismos y domesticación. En un trabajo de Yahyaoui *et al.* (2003) sobre variantes genéticas de  $\kappa$ -caseínas en cabras, se muestran los valores de las frecuencias génicas de siete alelos de esta proteína en nueve razas modernas de cabras y en una cabra salvaje (*Capra pyrenaica*). La cabra salvaje tiene dos alelos (B y F), correspondiendo a uno de éstos (F) una frecuencia génica de 0,98 y al otro (B) de 0,02, lo que en términos estadísticos podríamos decir que es casi monomórfica. Las razas domesticadas, en cambio, muestran los siete alelos y con diferente distribución. De éstos el más frecuente es el B con un valor (promedio) de 0,57, siguiéndole el alelo A con un 0,31, y el resto de los alelos se reparten el 0,12 de las frecuencias génicas. Este hecho es conocido por los científicos.

Creemos que a través de la historia de la domesticación hubo diferentes actitudes, pero siempre se han expresado de una manera que era concordante con los intereses de nuestra especie y no necesariamente con las posibilidades y necesidades del animal respecto al medio ambiente. La existencia de especies animales y vegetales obtenidas por selección que no podrían sobrevivir sin el cuidado del hombre son buenos ejemplos.

Por otro lado, conviene recordar que cuando se habla de *razas indígenas*, en relación a ciertas razas domésticas de países no europeos, los autores no quieren expresar al mismo tiempo que sean poblaciones que representen una cierta forma («fenotipos») de la especie natural, original, de vida silvestre. En rigor histórico, lo que se está expresando en realidad es que se trata de poblaciones de animales en las cuales la selección se ha llevado a cabo según las conveniencias y posibilidades de la población humana que la ha conservado.

La utilización de la leche de cabra, vaca y oveja en la alimentación humana ha traído como consecuencia la selección de diversos «fenotipos» en estas especies. Cabe señalar que, salvo que se aclare la excepción, todos los trabajos que se mencionan sobre cabras se han llevado a cabo en razas seleccionadas por el hombre. Algunas de estas razas corresponden a pueblos que las crían desde tiempos anteriores incluso a la historias de la tradición oral, por ejemplo, en el África sub-sahariana.

## ACERCA DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS CASEÍNAS

Es importante mencionar que los genes de las caseínas de todos los mamíferos estudiados se encuentran formando un cluster en el cromosoma que los cobija. Como ya se ha mencionado al referirnos al origen de las caseínas a partir de proteínas fijadoras de calcio que son secretadas al espacio intercelular, los genes de las caseínas ocupan una región muy pequeña y definida en los cromosomas. En los bovinos y caprinos, este cluster se encuentra en el cromosoma 6; en la cabra, la oveja y el hombre se halla en el cromosoma 4; en el ratón está ubicado en el cromosoma 5, mientras que en conejo está en el cromosoma 12.

Las variaciones genéticas de los cuatro tipos de caseínas en estas especies, sobre todo en cabras y vacas, han recibido particular atención, lo cual se debe al hallazgo, llevado a cabo por los ingenieros zootécnicos y biólogos, del hecho que determinados genotipos de caseínas estaban asociados a variables caracteres de producción y cualidades tecnológicas (Dove, 2000, Hallén *et al.*, 2007). Ello está ligado históricamente al hecho que las caseínas presentan diversos grados de expresión interespecífica dado que se extiende, respecto al total del proteoma lácteo, desde un 75%-80% en bovinos hasta el 40% en humanos (Sörensen *et al.*, 2003).

La principal característica de esta fracción es la complejidad de sus moléculas, que independientemente del proceso de secreción que no ofrece sensibles diferencias con el que se presenta en otras glándulas, poseen aspectos específicos relacionados con la secreción láctea. Los datos morfológicos indican que las primeras interacciones entre las caseínas se inician en el RE antes de su paso hacia el aparato de Golgi. En la vasta organela membranosa, se produce el control de calidad de las caseínas: las proteínas deben estar adecuadamente conformadas o asociadas formando los oligómeros antes del transporte vesicular de las micelas.

Todas las Cn tienen múltiples sitios de fosforilación incluyendo un sitio mayor ubicado en la región 100 – 110 en varias especies analizadas. Las fosforilaciones ocurren sobre las serinas o treoninas.

Las proteínas bien conformadas se exportan, siempre que el aporte de  $\alpha_{S1}$  caseína sea normal. Según varios estudios, el papel

de esta caseína sería capital en el transporte intracelular de la  $\beta$  y  $\kappa$  caseína en la cabra, puesto que ante la deficiencia de la  $\alpha_{s1}$  caseína se produce la acumulación de aquellas en las células epiteliales mamarias. Esta caseína sería la portadora de la información para un eficiente transporte desde el RE (Chanat *et al.*, 1999).

Como ya se ha mencionado, los estudios estructurales y genéticos de las caseínas de bovinos y otras especies de mamíferos han aportado de manera sostenida al conocimiento de los genes de  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  caseínas. Estas proteínas están codificadas por miembros de una familia multigénica originada por duplicación intragénica.

Este mecanismo implica retener función y secuencias nucleotídicas a pesar de las divergencias evolutivas, originando nuevas funciones biológicas, por aparición de nuevos genes. A la duplicación intragénica se le atribuye, como ya se dijo, el origen de fosfoproteínas secretorias unidas al calcio (SCPP) relacionadas genéticamente en mamíferos, que se encuentran en dientes, glándulas salivales y leche. En el tema que nos preocupa, el desarrollo de las caseínas ha sido un factor crítico para la evolución de los mamíferos.

Algunas características evolutivas interesantes se infieren del análisis de las secuencias e identificación de rasgos conservados en los genes de las caseínas de la leche y sugieren que estos genes proceden de un ancestro común con una función relacionada. En bovinos, las caseínas están codificadas por cuatro genes:  $\alpha_{s1}$  (*CSNIS1*);  $\alpha_{s2}$  (*CSNIS2*);  $\beta$  (*CSN2*) y  $\kappa$ -Cn (*CSN10*). Como se ha señalado en otras partes de este trabajo, las  $\alpha$ -Cn y la  $\beta$ -Cn son las llamadas sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  por lo que son estabilizadas en una suspensión coloidal por la interacción con la  $\kappa$ -Cn, proteína no sensible a la precipitación por  $\text{Ca}^{2+}$ .

Kawasaki (2003) ha localizado 12 genes funcionales responsables de la codificación de proteínas secretorias de leche, dientes, saliva y /o lágrimas en humanos, en una extensión de 776 kb sobre el cromosoma 4. Además, en esta región, se identifican cinco pseudogenes no funcionales y dos genes de funciones desconocidas. Los genes funcionalmente relacionados retienen un ligamiento altamente conservado, lo que representa un indicador de función y una historia filogenética común. En la descripción de la estructura de esta región los cuatro genes que codifican las proteínas secretadas por las glándulas salivales y la  $\kappa$ -Cn, se pre-

sentan en la parte distal del complejo. De hecho, tanto las caseínas sensibles al calcio, como así también la  $\kappa$ -Cn, y las proteínas secretadas por las glándulas salivales pertenecen a una misma familia de genes.

En bovinos, los genes que codifican las caseínas cubren 250 kb de ADN sobre el cromosoma 6 (Rijnkels, 2002) en un locus que evidencia el siguiente orden  $\alpha_{S1}$ -Cn;  $\beta$ -Cn;  $\alpha_{S2}$ -Cn,  $\kappa$ -Cn (Ferretti *et al.*, 1990). El ligamiento más estrecho de sólo 20 kb se presenta entre los genes  $\alpha_{S1}$  y  $\beta$ -Cn. Los genes restantes de  $\alpha_{S2}$  y  $\kappa$ -Cn se ubican hacia el extremo 5' a 70 y 120 kb del gen que codifica la  $\beta$ -Cn.

Como ya hemos mencionado, las comparaciones interespecíficas de las secuencias de aminoácidos de las caseínas de la leche permitió resaltar algunas características evolutivas interesantes además del probable origen común de los genes de estas proteínas: la rápida evolución, las similitudes de los péptidos señal y de los sitios de fosforilación de las caseínas sensibles al calcio. La similitud de los extremos 5' y 3' en el transcripto primario de  $\alpha_{S1}$ ,  $\beta$  y  $\alpha_{S2}$  en contraste con las regiones codificantes de la proteína sugiere exigencias citológicas de la integridad estructural del péptido señal comprometido en un eficiente transporte del ribosoma responsable de la traducción de las proteínas, hacia el RE.

Se ha secuenciado la región proximal cercana a 2kpb del extremo 5' de la unidad transcripcional de numerosas proteínas de camella, entre ellas, las de la leche. El análisis de las secuencias mostró que todas las regiones 5' de los genes de la leche de camella están estrechamente relacionadas con sus homólogos en otras especies, sin tener en cuenta el nivel de expresión. Las secuencias del gen en esta región pueden incluirse en dos grupos. En el grupo I, el contenido promedio de GC es de 54%, mientras que, en el grupo II, es de 38% en donde se pueden identificar seis motivos recurrentes en todas las secuencias promotoras. Las secuencias del grupo I comprende las secuencias de genes de algunas proteínas del lactosuero y de las membranas del glóbulo graso de la leche. Las secuencias del grupo II lleva las secuencias correspondientes a las caseínas, proteínas del lactosuero y las secuencias de la butirofilina. Funcionalmente los motivos son elementos que constituyen sitios de unión para numerosos factores reguladores que inducen o reprimen la transcripción. Entre estos elementos se incluyen receptores de hormonas y los factores generales o específicos de la transcripción.

En rata, la unidad transcripcional de la  $\beta$ -Cn, con 9 exones y 8 intrones, comprometen 7,2 Kb. El tamaño de los exones varía entre 21 y 525 kb, siendo los intrones más largos y representando aproximadamente el 85% del gen (Jones *et al.*, 1985). De los nueve exones el I es portador del extremo 5' y las secuencias no traducidas. En el exón II de 63 pb, se presentan las secuencias del péptido señal y los dos primeros aminoácidos de la  $\beta$ -Cn. Los exones más cortos están representados por el IV y V de 21 y 24 pb respectivamente, codifican el extremo amino terminal hidrofílico y contienen los potenciales sitios de fosforilación. El principal lugar de fosforilación se ubica en el sitio de unión del exón IV y V. El exón más largo es el VII, que codifica la región hidrofóbica carboxiterminal de la molécula. El exón VIII contiene el último codón de la proteína y además es portador junto al exón IX del extremo 3' no traducible del transcripto primario de la  $\beta$ -Cn. Este esquema de la unidad transcripcional se conserva en cabras, humanos, bovinos, conejos y ratones (Bonsing y McKinlay, 1987; Yoshimura y Oka, 1990; Roberts *et al.*, 1993; Hansson *et al.*, 1994; Provot *et al.*, 1995) a nivel de exones y de los sitios de fosforilación de las proteínas. Las variaciones de tamaño de la unidad transcripcional que se presentan entre las especies analizadas, se atribuyen al tamaño de los intrones.

Las características de la estructura y secuencias genómicas de las unidades transcripcionales de  $\alpha_{S1}$  y  $\alpha_{S2}$  en bovinos revelan algunas homologías de tamaño (17 a 18,5 kb), número de exones (17 -18), sitios de fosforilación, extremo 5' y terminal hidrofóbica. (Koczan *et al.*, 1991; Groenen *et al.*, 1993). La estructura genómica del gen para  $\kappa$ -Cn presenta sensibles diferencias con las secuencias caracterizadas del ADN de las caseínas sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\alpha_{S1}$ ,  $\beta$  y  $\alpha_{S2}$ , como el tamaño del péptido señal y la distribución de los sitios de fosforilación entre lo más sobresaliente. Las secuencias correspondientes al gen en bovinos alcanzan un tamaño de 13 kb, distribuidas en cinco exones y extensos intrones (Alexander *et al.*, 1988). Los primeros 65 pb pertenecen al exón I donde se reconoce la región sin traducir en el transcripto, la que se completa con parte de las secuencias del exón II. Este último contiene los codones (19) del péptido señal. El exón III lleva las secuencias restantes del péptido señal y además las secuencias de la terminal amino de la  $\kappa$ -Cn. El exón IV codifica la mayor parte de la proteína y el extremo 3' están contenidos parte en el exón IV y el resto en el V. Esta estructura del

gen descripta en bovinos se conserva en humanos y en conejo, aunque los intrones son más cortos en este último (Baranyi *et al.*, 1996; Edlund *et al.*, 1996).

Las homologías de ciertas regiones puestas en evidencia por la biología molecular contrastan con la heterogeneidad de estas proteínas reconocidas por electroforesis. Las variantes genéticas ocurren naturalmente, determinando diferentes formas de la proteína, generalmente debidas a pequeñas diferencias en los sectores codificantes.

Los polimorfismos de las proteínas de la leche se deben a sustituciones o deleciones de aminoácidos en la cadena polipeptídica. Estos eventos son consecuencia de mutaciones que han acaecido en las secuencias nucleotídicas del ADN codificante. Los polimorfismos estructurales también producen una variabilidad alélica cuantitativa que se traduce en diferencias de expresión de las proteínas. También existen polimorfismos debido a modificaciones post transcripcionales tales como diferentes grados de fosforilaciones y glicosilaciones.

### LA $\alpha_{s1}$ -CASEÍNA

En el campo de la relación genotipo/caracteres de producción, probablemente sea la  $\alpha_{s1}$ -caseína de la leche de cabra la proteína sobre la cual más publicaciones existen, o al menos, aquella proteína sobre la que más se trabajó. La proteína se presenta en las denominadas razas internacionales (Saanen, Alpina, Nubias) en una concentración media de 3,2 g/L. Esta caseína presenta numerosos alelos, de los cuales se sabe que algunos se expresan de forma tal que se encuentran en la leche en pequeña cantidad respecto a otros. Para el caso, el más conocido es el del alelo F de esta caseína en la cabra. Los animales que portan el alelo A, B o C, sintetizan una cantidad normal de esta caseína, mientras que aquellos animales que poseen los alelos D o F producen leche con una concentración de esta caseína que es la sexta parte de los primeros. Los animales con el alelo E sintetizan una cantidad intermedia (Grosclaude *et al.*, 1987; Grosclaude *et al.*, 1994).

Bevilacqua *et al.*, (2002) mencionan 11 alelos para esta proteína; Ramunno *et al.* (2005) señalaron que existen 15 alelos para la  $\alpha_{s1}$ -caseína de cabra; Moatsou *et al.* (2008), por su parte, tuvieron en cuenta 17 alelos para esta caseína. Aún descontando los

desfasajes de intervalos que en el momento de la publicación pudieran entorpecer el consenso en la tipificación, es notorio que a medida que transcurre el tiempo se incrementa el número de alelos detectados. Como ocurre también en otros campos de la investigación, este aumento se debe, en forma importante, a los avances metodológicos de la genética.

El gen de la  $\alpha_{s1}$ -caseína de cabra tiene una similitud del 57% con el correspondiente de la vaca. Este gen contiene una gran cantidad de intrones, 19 en total, los cuales ocupan un 67% del largo del gen (Ramunno *et al.*, 2004). El primer exón no es codificante, lo cual también ocurre en otros bóvidos. Los sitios en que se lleva a cabo el corte y empalme sigue la regla de 5' GT - 3' AG. Asimismo, como es conocido en los aspectos generales de estructura génica, éste muestra en el extremo 5' proximal los sitios de la caja TATA y GATA, y un sitio señal para la poliadenilación hacia el extremo 3'. Este sitio se halla a unos 16.660 nucleótidos de la iniciación, la parte codificante del gen (Ramunno *et al.*, 2004). El elemento GATA es común a numerosas otras funciones de regulación génica relacionadas con diversos sistemas fisiológicos.

Si bien ya hemos mencionado a los principales elementos y regiones reguladoras que forman parte de los genes de las caseínas, consideramos oportuno indicar los que específicamente se han hallado en la  $\alpha_{s1}$ -caseína de la cabra, aunque varios de ellos ya han sido indicados. Además de los sitios TATA y GATA, también se encuentran en sector promotor 5' los elementos (Ramunno *et al.*, 2004) destinados a la unión de factores de transcripción: los motivos de la Milk Box (*la caja de leche*) que se encuentra en todos los genes de las caseínas. De manera que este sector contiene:

- a) el complemento revertido del *receptor de progesterona*,
- b) dos sitios amplificadores CCAAT al que se unen las C/EBP,
- c) un sitio para el *factor activador de la célula mamaria*,
- d) el sitio para STAT5,
- e) también se encuentran en esta región un amplificador tipo SV40,
- f) un elemento para el *factor nuclear octámero-1* (NF Oct-1),
- g) un elemento para unión del factor YY1,
- h) dos sitios para unión del factor PMF (*factor nuclear mamario específico de preñez*), i) tres sitios para la *proteína activadora 1* (AP-1),

j) y existen otros numerosos sitios para YY1 y dos adicionales para NF Oct-1.

Los estudios sobre sectores promotores homólogos dentro de los artiodáctilos estudiados o comparados (vaca, oveja y yak) muestran en esta caseína una similitud del 96%, mientras que con el correspondiente de conejo es de un 88%, con humanos del 80% y con la rata del 77%. Como se puede apreciar la similitud del sector promotor es muy grande en relación al sector que codifica la proteína madura.

A diferencia con lo que ocurre en otras especies, por ejemplo la nuestra, en la leche de *vaca* la caseína más abundante es la  $\alpha_{s1}$ -caseína. Estudios llevados a cabo por Vanselow *et al.* (2006) sobre los mecanismos de regulación de la síntesis de esta caseína en ubres de vacas a la mitad de la lactación han revelado que existen sitios amplificadores para unión de STAT5 a una distancia de 10 kpb corriente arriba del gen. Estos sitios de unión cambian, en respuesta a una mastitis aguda, su afinidad por los factores mencionados, de forma tal que disminuye la expresión de la proteína. El mecanismo identificado consiste en la metilación de citosinas en el sitio mencionado y en un contexto de CpG. Esta metilación es reconocida por una proteína de unión específica, tal como MeCP2, la cual tiene actividad de desacetilasa. Esta *proteína de unión-enzima* procede a desacetilar las histonas lo que trae como consecuencia el empaquetamiento cerrado, la condensación de la cromatina y la suspensión de la transcripción. Además, también parece ser afectado el mecanismo de la traducción. Seguramente este mecanismo de regulación también se presenta en otros bóvidos dada la similitud de las estructuras de los genes de caseínas en los mamíferos en general y en los rumiantes en particular.

La cantidad de proteína que se sintetiza es dependiente del tipo de alelo que la representa. Como ya se ha adelantado, en la cabra hay tres tipos de alelos que se expresan en forma distinta:

1. La cantidad de  $\alpha_{s1}$ -caseína de los genotipos que tienen exclusivamente los alelos A, B1, B2, B3, B4, C, H, I, y M alcanzan una concentración de unos 3,5 g/L. Todas estas variantes genéticas actúan en forma similar.

2. Los animales que poseen exclusivamente los alelos F y G poseen alrededor de 0,45 g/L de  $\alpha_{s1}$ -caseína en la leche.

3. La leche de animales con los alelos E tienen una concentración intermedia, de 1,1 g/L.

La existencia y detección de distintos alelos de esta caseína en la cabra tiene un interés especial para la producción de leche y para la tecnología láctea. Además de la incidencia directa del genotipo en la cantidad de caseínas presente en la leche existen otras varias razones enumeradas por Dettori *et al.* (2009) para sostener que el genotipo tiene importancia adicional en la producción.

a) El contenido de caseína (ya mencionado), de proteína total y de grasa es mayor en las leches de animales de genotipo AA.

b) El número de caseína es mayor en las leches de animales AA, mientras que es menor en las FF.

c) El tamaño de las micelas es menor en los animales del genotipo AA y mayor en los que detentan el FF.

d) La coagulación es más compacta y gel más firme en los animales AA respecto a los FF.

El gen de la  $\alpha_{S1}$  caseína de cabra contiene 19 exones que se extienden en 17 kb en la unidad transcripcional, con 13 alelos (Martin, 1993; Grosclaude *et al.*, 1994) asociados a siete variantes alélicas con diferentes niveles de expresión. La  $\alpha_{S1}$ Cn A, B y C alcanzan el máximo nivel de expresión, pero la variante  $\alpha_{S1}$ Cn E se presenta con valores intermedios entre los primeros y las variantes  $\alpha_{S1}$ Cn F y  $\alpha_{S1}$ Cn G. La variante E tiene una longitud determinada por 199 aminoácidos que la diferencian de las variantes A, B y C por sustituciones de aminoácidos (Brignon *et al.*, 1990). El alelo B a su vez contendría cuatro variantes proteicas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> y B<sub>4</sub> originadas por sustitución de aminoácidos, sin consecuencias sobre la carga neta de la proteína. La variante B<sub>1</sub> se considera el tipo original, dada las homologías que se presentan con sus homólogas en bovinos y ovinos. Existe una delección en la variante B<sub>2</sub> de 37 aminoácidos que origina la variante F, que tiene asimismo como consecuencia una disminución en el grado de fosforilación por la pérdida de cinco serinas (Brignon *et al.*, 1990).

El análisis de la unidad transcripcional del alelo F reveló la pérdida de tres exones (9, 10 y 11) por probables fallas del splicing alternativo durante la maduración del transcripto primario, por delección de un nucleótido en el exón 9. En cambio, la variante  $\alpha_{S1}$ Cn G habría surgido por eliminación del exón 4. La variante  $\alpha_{S1}$ Cn E surgió por inserción de secuencias altamente repetidas (Secuencias LINE) en el último exón. Tanto las delecciones ( $\alpha_{S1}$ Cn F y  $\alpha_{S1}$ Cn G) como la inserción ( $\alpha_{S1}$ -Cn E) se re-

flejan en el ARNm con disminución de la concentración ( $\alpha_{S1}$ -Cn F) o la falta de estabilidad ( $\alpha_{S1}$ -Cn E) y, en consecuencia, una disminución de la expresión del gen (Leroux *et al.*, 1992; Jànsa-Pèrèz, *et al.*, 1994). Se destacó que ciertos ejemplares carecen de la proteína madura, debido a la expresión nula del gen, que a nivel de secuencias genómicas son consecuencia de una delección muy extensa, de alrededor de 8 Kb en el extremo 3' del transcrito primario.

En una población de cabras del sur de Italia, se identificaron cuatro variantes de  $\alpha_{S1}$ Cn :H, I, L, M. La variante M es muy rara y es una consecuencia mutacional de transición a nivel del aminoácido 23 del exón 9, en donde se sustituye una serina por una leucina (Chianese *et al.*, 1997a, 1998). Este cambio de aminoácido se refleja asimismo en una variación de los niveles de fosforilación. Todas las cabras fenotípicamente M, son heterocigotas asociadas a las variantes F o B.

El análisis de los aminoácidos del péptido M demostró ser una molécula híbrida, codificada por secuencias homólogas que se encuentran en los transcritos primarios de los alelos F y A correspondientes a los extremos 5' y 3', respectivamente. Se destaca que la secuencia atribuida al alelo A no es portadora del cambio de nucleótido en el exón 9. Bevilacqua *et al.* (2002) atribuyeron el origen de la variante M a una recombinación interalélica entre los alelos de las variantes A y B<sub>2</sub>. En esta propuesta B1 y un alelo desconocido parental identificado como W sería producto de la recombinación de A y B<sub>2</sub>. En este alelo desconocido producto de la recombinación habría tenido lugar la mutación por transición originando el alelo M. Aunque también se puede pensar que los alelos B1 y el M habrían sido los ancestrales, la baja frecuencia de estos alelos en las cabras hace pensar en la propuesta anterior. Esta hipótesis explicaría el origen de la diversidad alélica de aquellos sistemas donde se ponen en evidencia proteínas con un grado muy acentuado de polimorfismo.

Como se ha expuesto, algunas de las variantes genéticas en las cabras presentan una masa molecular distinta a la esperada partir de la estructura de la región codificante del gen. Ello es debido a que existen mecanismos de corte y empalme alternativo en la expresión de algunos genes, particularmente en los de alelos F.

En *bovinos*, se ha propuesto la existencia de 5 variantes de la proteína:  $\alpha_{S1}$ Cn (A, B, C, D y E) (Mercier, 1981; Fiat y Jollès, 1989) pero otros autores proponen cuatro variantes (Martin *et al.*,

1999). Entre ellas  $\alpha_{S1}$ Cn B sería la más común, se presenta como un monómero de 199 aminoácidos, de los cuales 8 serinas se encuentran fosforiladas. La variante A es la más rara, y difiere de la B por una delección de 13 aminoácidos. La variante C se considera la forma ancestral. La  $\alpha_{S1}$  Cn bovina se puede presentar fosforilada en dos formas, dependiendo del contenido de 8 o 9 fosfatos/mol.

Otros estudios han detectado en esta especie 6 variantes electroforéticas de la  $\alpha_{S1}$ -caseína, las cuales se atribuyen a otros tantos alelos A, B, C, D, E, y F, además de un alelo (G) cuyo gen tiene la especial característica de poseer un elemento (no caseínico) insertado en el último exón (Rando *et al.*, 1998). Esta circunstancia reduce la vida media del RNAm de la mencionada variedad de  $\alpha_{S1}$ -caseína, reduciendo en consecuencia la cantidad de proteína sintetizada. Desde el punto de vista de la expresión de las proteínas, este gen es análogo al alelo E del gen de la misma caseína en la cabra.

En el ganado bovino Kangayam, perteneciente a la especie *Bos indicus*, del sur de la India, se han encontrado dos alelos para esta caseína: el alelo C que se encuentra con una frecuencia notoriamente mayor (0,85), el resto ( $\sim$ 0,15) corresponde al alelo B, encontrándose en equilibrio genotípico (Jeichitra *et al.*, 2003). Estas altas frecuencias del alelo C de la  $\alpha_{S1}$ -caseína parecen ser la generalidad en las razas zebuinas del Indostán.

La organización genómica del gen  $\alpha_{S1}$ Cn refleja un alto grado de conservación del número y longitud de los exones en vaca, cabra y conejos, pero en esta última especie se observaron los exones 3 y 7 ausentes en rumiantes e inversamente hay dos exones en rumiantes 13 y 14, ausentes en conejos (Jolivet *et al.*, 1992).

La expresión de  $\alpha_{S1}$ Cn en humanos se pone de manifiesto en las electroforesis PAGE en presencia de SDS por la aparición de varias bandas lo que sugiere variantes de la proteína. Por el análisis secuencial de los transcritos primarios del gen, se identificaron tres tipos de moléculas. El transcripto tipo I es el más largo y codifica 185 aminoácidos, en donde se incluye el péptido señal. El tipo II se origina por una delección de tres nucleótidos de las posiciones 203 a 205. Por último el tipo III, se diferencia del transcripto tipo I por la delección de un mayor número de nucleótidos, desde 245 a 268 (24) y además una mutación por transición sin efectos para la proteína (Johnsen *et al.*, 1995). Ade-

más, en humanos, sólo tres asparaginas se encuentran glicosiladas, las correspondientes a Asp 14, 54 y 154, pero tiene 16 serinas y 4 treoninas. De éstas, nueve de las serinas y una treonina se encuentran en condiciones posicionales de ser reconocidas por la quinasa para la fosforilación de las caseínas de la glándula mamaria. Sin embargo, la  $\alpha_{S1}$ Cn en humanos existe en tres variantes de fosforilación: una forma no fosforilada, una forma con fosforilación en la serina 18, y una variante con las serinas 18 y 26 fosforiladas. La principal es la variante con una fosforilación (50%), le sigue la variante nula (30%), y por último la doble fosforilada (20%).

La fosforilación de esta caseína tiene diferencias entre especies. En bovinos, se encuentra hasta en nueve posiciones, en ovinos, hasta en once, y en camellos, hasta en seis posiciones, en función de las variantes genéticas, sólo por citar algunos ejemplos. Lo más llamativo es la presencia en humanos de una región rica en serina entre los residuos Ser70-Glu78 que no se encuentra fosforilada, como lo es la secuencia homóloga en los rumiantes. La ausencia de fosforilación se atribuye a modificaciones en la región del gen en la  $\alpha_{S1}$ Cn humana que no le permiten a las serinas fosforilarse.

### LA $\alpha_{S2}$ -CASEÍNA

Se presenta en la leche de los bóvidos y otras numerosas especies pero no se ha comprobado su existencia en todas las especies estudiadas. Esta caseína parece ser la que con más frecuencia está ausente de la leche de los mamíferos.

Asimismo se presenta en forma dispar en las especies estudiadas, siendo sus homólogas la  $\gamma$  en rata, y las  $\gamma$  y  $\epsilon$  en ratón, Cn-A en cobayo y en las  $\alpha_{S2a}$ -Cn y  $\alpha_{S2b}$ -Cn en conejos para citar los ejemplos más estudiados. El análisis de las secuencias de aminoácidos permitió identificar la homología del péptido señal en todos los casos pero existe una gran divergencia entre las proteínas maduras. La homología a nivel de aminoácidos entre conejos y ratones es menor al 40%, mientras que si se compara bovinos y cerdo se alcanza un nivel algo mayor, cercano al 64%.

En la leche de cabra se encuentra en una concentración media de unos 3,9 g/L y una variación media de 0,5 g/L. En esta especie se encuentran, por lo menos seis alelos A, B, C, D, E, y

F de los cuales los tres primeros son las más comunes, y el F el que está poco representado en las razas internacionales. Es común que en razas locales se encuentren otros alelos (Bozkaya *et al.*, 2008).

Por otra parte, hay que mencionar que esta proteína es la que alcanza, aunque con una distribución variable, el mayor grado de fosforilación entre las caseínas de esta especie, el cual va de 6 a 11 P por molécula. La  $\alpha_{s2}$ Cn se caracteriza por ser una proteína altamente fosforilada, alcanzando en bovinos cuatro formas bien diferenciadas debido al contenido de los grupos fosfatos 10 a 13 (Brignon *et al.*, 1977).

## LA $\beta$ -CASEÍNA

La estructura genómica de la  $\beta$ -Cn revela un alto grado de conservación del número de exones, pero con algunas diferencias relacionadas con la longitud de éstos en humanos, ratas, vaca, oveja y conejo. En humanos, se ha visto que se ha eliminado el exón 3 en el transcripto primario del ARNm de esta proteína. Esta delección sería una consecuencia directa de una mutación de nucleótidos que altera el mecanismo normal de corte y empalme. Este suceso se conoce con el nombre de conversión críptica del exón (Johnsen *et al.*, 1995).

Esta caseína es la que se presenta en mayor concentración en la leche de la cabra, alrededor de 11 gr/L. En esta especie tiene menos variantes genéticas que la  $\alpha_{s1}$ -caseína. Moatsou *et al.* (2008) mencionan cuatro alelos: A, B, C, y D, más la existencia de dos alelos nulos y uno silencioso. En la Figura 16, se muestra un esquema indicativo de las regiones promotoras proximal y distal de la  $\beta$ -caseína, dibujado a partir de la información corriente en bovinos y humanos.

En bovinos hay 13 variantes de la  $\beta$ -Cn: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G. Un alelo identificado como A4 se describió en una raza nativa de Corea. De las formas antes enumeradas, las más comunes están representadas por los alelos A1 y A2, el menos frecuente es el alelo B, y los más raros son A3 y C (Farrell *et al.*, 2004). La diferencia entre la variante A1 y A2 consiste en la sustitución de una histidina de la primera variante por una prolina de la segunda en la posición 67. Por otra parte, la variante C se diferencia de la B por una sustitución de



transcripción (Kolb, 2003). Este intrón posee: a) actividad de corte y empalme, b) la referida de amplificación por la cual se aumenta la síntesis alrededor de dos veces y media, lo que contribuiría también según este autor a la estabilidad del RNAm.

La región promotora proximal del gen que codifica la  $\beta$ -Cn de ratón reveló una estructura característica compuesta por tres regiones altamente conservadas y designadas como bloques A, B y C. Los bloques A y B comparten secuencias similares. El bloque C se encuentra aproximadamente a 20 pares de bases corrientes arriba de la caja TATA y aproximadamente a 40 pares de bases corriente abajo del bloque B. La región completa se encuentra entre -258/+7 en el gen de ratones y -355/-1 en el gen de rata. Numerosas proteínas nucleares se unen a estas tres regiones representando a los factores de transcripción que intervienen en la inducción de la expresión del gen.

En humanos, las caseínas predominantes son las  $\beta$  y  $\kappa$  caseína las cuales difieren de las de rumiantes por un menor grado de fosforilación. La  $\beta$ -caseína se presenta como una sola proteína fosforilada a diversos niveles, de cero a cinco ( $\beta$ -Cn-0P a  $\beta$ -Cn-5P) (Groves y Gordon, 1970).

La complejidad del splicing alternativo co-transcripcional y la incidencia de los elementos *cis* han sido comprobadas a través de los mecanismos de regulación que operan en la región 5' distal del gen de la  $\beta$ -caseína en equinos. Se pudo corroborar que el procesamiento de los ARNm en los eucariontes está acoplado con la transcripción. El principal eslabón funcional entre ellos es la región C-terminal (CTD) de la ARN polimerasa II en la cual la fosforilación se comporta como un interruptor de la elongación durante la transcripción y paralelamente incide en el mecanismo de maduración del transcrito primario. Por lo tanto, el splicing alternativo representa una complicación adicional en el proceso co-transcripcional de los ARNm (Black, 2003).

En este mecanismo operan una serie de proteínas que funcionan como activadores o represores de la inclusión de los exones en los ARNm. Asimismo no se descarta la influencia de la estructura secundaria del ARN y la estructura del promotor del gen en el procesamiento. Los activadores del corte y empalme son comúnmente proteínas que se localizan en el exón o en los límites del intrón y están probablemente implicadas en el restablecimiento de los factores proteicos que intervienen en el corte y empalme de exones. Un poderoso elemento *cis* del gen de la

$\beta$ -Cn se identificó en el intrón 1 con efectos independientes del correspondiente al efecto promotor sobre el splicing, asimismo interviene incrementando la inclusión de numerosos exones, aunque ellos se encuentren localizados a varios pb de distancia. Este elemento se ha identificado como ISE1 en el exón 1.

### LA $\kappa$ -CASEÍNA

Desde el punto de vista funcional, esta caseína es distinta al resto. Su capacidad de mantener en suspensión a toda la micela la coloca en una situación central en la estabilidad y la homeostasis física de la leche. En la cabra, esta caseína se encuentra en una concentración media de unos 3,8 g/L y presenta trece variantes alélicas y tres mutaciones silenciosas (Moatsou *et al.*, 2008), de las cuales la mayor parte se han encontrado en razas indígenas. Se reconocen cinco variantes A, B, C, D, F, G y algunos subtipos. En general, la  $\kappa$ -caseína se presenta bifosforilada, y, en menor medida, monofosforilada.

En un estudio sobre la estructura del gen y las frecuencias génicas de esta proteína en las cabras, Yahyaoui *et al.* (2003) han llegado a la conclusión que el alelo F de esta proteína constituye el gen original. Esta forma del gen habría dado origen al alelo B, el cual a su vez habría engendrado los alelos A y E. Por otra parte, el alelo F sería también el antecesor del alelo G que generaría los alelos C y D.

Mediante el análisis del gen con la técnica de detección de polimorfismos conformacionales de hebra sencilla, Prinzenberg *et al.* (2005) han demostrado la existencia de 16 alelos, trece de los cuales se expresan y tres constituyen genes silenciosos. La mayor parte de las variantes encontradas corresponden a razas nativas de países del Cercano Oriente.

En bovinos, la  $\kappa$ -caseína se presenta en las formas principales A, B y C, las que difieren por los aminoácidos ubicados en la posición 136 y 148. En el alelo A, responden a Thr y Asp y en la forma B a Ile y Ala, respectivamente. La diferencia entre B y C se presenta por la sustitución de un aminoácido en la posición 97, pero no se registran cambios a nivel de la carga neta de la proteína. En el ganado bovino europeo, las variantes más comunes están constituidas por los alelos A y B. Los estudios sobre las variaciones de esta caseína en el gen correspondiente,

determinado en el semen de toros, ha demostrado que, en el búfalo egipcio, este gen es monomórfico (Abdel Dayem *et al.*, 2009). En cambio, las determinaciones sobre la misma caseína en el yak (*Bos grunniens*) de las provincias del occidente de China mediante la técnica de polimorfismo conformacional de hebra sencilla demostró la existencia de variantes en el gen que se traducirían en dos variantes de proteína a las que se denominaría alelos G y C (Bai *et al.*, 2008).

Nuestro grupo de trabajo determinó mediante PAGE las variantes genéticas de  $\kappa$ -caseína de ganado bovinos Criollo del noroeste argentino hace más de dos décadas. La información obtenida evidenciaba una frecuencia génica de 0,72 para el alelo A y de 0,28 para el alelo B, lo que ponía de manifiesto la similitud con las razas europeas occidentales (Rabasa de Sal Paz *et al.*, 1983).

Esta proteína constituye la caseína que menos fosfato porta, identificándose un único sitio de fosforilación, en la región C-terminal de la molécula. También existe diferencia en el tamaño del péptido señal, con 21 aminoácidos, en vez de los 15 característicos de las otras caseínas. Como se sabe es una molécula altamente glicosilada y los grupos de carbohidratos están unidos a serinas o treoninas de la región C-terminal de esta caseína.



# Bibliografía

---

- Abdel Dayem, A. M. H., K. Mahmoud, M. F. Nawito, M. M. Ayoub y S. F. Darwish. 2009. Genotyping of kappa-casein gene in Egyptian buffalo bulls. *Livestock Science*, 122: 286-289.
- Accorsi, P. A., B. Pacioni, C. Pezzi, M. Formi, D. J. Flint y E. Seren. 2002. Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 85: 507-513.
- Akers, R. M. 1985. Lactogenic hormones: binding sites, mammary growth, secretory cell differentiation, and milk biosynthesis in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 68: 501-519.
- Akers, R. M. 2006. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89: 1222-1234.
- Alexander, L. J., A. F. Stewart, A. G. Mackinlay, T. V. Kapelinskaya, M. Tkach y S. I. Gorodetsky. 1988. Isolation and characterization of the bovine  $\kappa$ -casein gene. *European Journal of Biochemistry*, 178: 395-401.
- Allan, G. J., E. Tonner, M. C. Barber, M. T. Travers, J. H. Shand, R. G. Vernon, P. A. Kelly, N. Binart y D. J. Flint. 2002. Growth hormone, acting in part through the insulin-like growth factor axis, rescues developmental, but not metabolic activity in mammary gland of mice expressing a single allele of the prolactin receptor. *Endocrinology*, 143: 4310-4319.
- Anderson, M. 1981. Inhibition and lipolysis in bovine milk by protease peptone. *Journal of Dairy Research*, 48: 247-252.
- Aschaffenburg, R. y J. Drewry. 1953. Occurrence of different beta-globulins in cow's milk. *Nature*, 176: 218-219.
- Atwood, C. S., R. Hovey, J. P. Glover, G. Chepko, E. Ginsburg, W. G. Robison y B. K. Vonderhaar. 2000. Progesterone induces side-branching of the ductal epithelium in the mam-

- mary glands of peripubertal mice. *Journal of Endocrinology*, 167: 39-52.
- Aumuller, G., M. Bergmann y J. Seitz. 1991. Immunohistochemical distribution of sulfhydryl-oxidase in human testis. *Cell Tissue Research*, 266: 23-28.
- Azuma, N. y K. Yamauchi. 1987. A glyco-phosphoprotein in human milk. *Journal of Dairy Research*, 54: 199-205.
- Azuma, N., A. Maeta, K. Fukuchi y C. Kamo. 2006. A rapid method for purifying osteopontin from bovine milk and interaction between osteopontin and other milk proteins. *International Dairy Journal*, 16: 370-378.
- Bachali, S., M. Jager, A. Hassanin, F. Schoentgen, P. Jollès, A. Fiala-Miedoni y J. Deutsch. 2002. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozyme and the evolution of lysozyme function. *Journal of Molecular Evolution*, 54: 652-664.
- Bachelot, A. y N. Binart. 2007. Reproductive role of prolactin. *Reproduction*, 133: 361-369.
- Bai, W., R. H. Yin, S. J. Zhao, Y. C. Zheng, J. C. Zhong y Z. H. Zhao. 2008. Characterization of a  $\kappa$ -casein genetic variant in Chinese yak, *Bos grunniens*. *Journal of Dairy Science*, 91: 1204-1208.
- Bailey, J. P., K. M. Nieport, M. P. Herbst, S. Srivastava, R. Serra y N. D. Horseman. 2004. Prolactin and transforming growth factor- $\beta$  signaling exert opposing effects on mammary gland morphogenesis, involution, and the R $\kappa$ -Forhead pathway. *Molecular Endocrinology*, 18: 1171-1184.
- Baranyi, M., A. Aszodi, E. Devinoy, M. L. Fontaine, L. M. Houdebine y Z. Bosze. 1996. Structure of the rabbit  $\kappa$ -casein encoding gene: expression of the cloned gene in the mammary gland of transgenic mice. *Gene*, 174: 27-34.
- Barroso, A., S. Dunner y J. Cañón. 1999. Technical note: use of PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for detection of bovine  $\beta$ -casein variants A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, and B. *Journal of Animal Science*, 77: 2629-2632.
- Bauman, D. E., J. W. Perfield, K. J. Harvatine y L. H. Baumgard. 2008. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model. *The Journal of Nutrition*, 138: 403-409.
- Beg, O. U., H. von Bahr-Lindström, Z. H. Zaidi y H. Jörvall. 1987. Characterisation of a heterogeneous camel milk whey non casein protein. *FEBS Letters*, 216: 270-274.

- Ben Jonathan, N., C. R. La Pensee y E. W. La Pensee. 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrinology Reviews*, 29: 1-41.
- Ben Shaul, D. M. 1962. The composition of the milk of wild animals. *International Zoo Yearbook*, London, pp. 333-342.
- Berg, M., A. M. Dharmarajan y B. J. Waddell. 2002. Glucocorticoids and progesterone prevent apoptosis in the lactating rat mammary gland. *Endocrinology*, 143: 222-227.
- Bernard, C. 1959. *Introducción al estudio de la medicina experimental*. El Ateneo, Buenos Aires.
- Bevilacqua, C., P. Ferranti, G. Garro, C. Veltri, R. Lagonigro, C. Leroux, E. Pietrola, F. Addeo, F. Pilla, L. Chianese y P. Martin. 2002. Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new  $\alpha_{s1}$ -casein. *European Journal of Biochemistry*, 269: 1293-1303.
- Bhattacharyya, J. y K. Das. 1999. Molecular chaperone-like properties of an unfolded protein,  $\alpha_s$ -casein. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 15505-15509.
- Black, D. L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 72: 291-336
- Bonnet, M., I. Gourdou, C. Leroux, Y. Chilliard y J. Djiane. 2002. Leptin expression in the ovine mammary gland: putative sequential involvement of adipose, epithelial, and myoepithelial cells during pregnancy and lactation. *Journal of Animal Science*, 80: 723-728.
- Bonsing, J. y A. G. McKinlay. 1987. Recent studies on nucleotide sequences encodig the caseins. *Journal of Dairy Research*, 54: 447-461.
- Bouguyon, E., C. Beauvallet, J. C. Huet y E. Chanut. 2006. Disulphide bonds in casein micelles from milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343: 450-458.
- Bozkaya, F., D. Mundan, O. Karabulut, M. Yerturk, S. Gurler y F. Aral. 2008. An investigation on the distribution of O and D alleles of the CSN1S2 gene in goat populations raised in southeastern region of Turkey. *Small Ruminant Research*, 78: 193-196.
- Brawand, D., W. Wahly y H. Kaessmann. 2008. Loss of egg yolk genes in mammals and the origin of lactation and placentation. *PLOS Biology*. 6 (3): 507-516.

- Brignon, G., B. Ribadeau Dumas, J. C. Mercier y J. P. Pelissier. 1977. Amino acid sequence of bovine  $\alpha_{S2}$ -casein. *FEBS Letters*, 76: 274-279.
- Brignon, G., M. F. Mahé, B. Ribadeau Dumas, J. C. Mercier y F. Grosclaude. 1990. Two of the three genetic variants of goat  $\alpha_{S1}$ -casein which are synthesized at a reduced level have an internal deletion possibly due to altered RNA splicing. *European Journal of Biochemistry*, 193: 237-241.
- Brinkman-Van der Linden, E., E. R. Sjoberg, L. R. Juneja, P. Crocker, A. Varki y N. Varki. 2000. Loss of N-glycolylneuraminic acid in human evolution. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 8633-8640.
- Brisken, C., S. Park, T. Vass, J. Lydon, B. W. O'Malley y R. A. Weinberg. 1998. A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 5076-5081.
- Brody, E. P. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, 84: 539-546.
- Brown, G. K. 2000. Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *Journal of Inheritable Metabolic Diseases*, 23: 237-246.
- Burgoyne, R. D. y J. S. Duncan. 1998. Secretion of milk proteins. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3: 275.
- Bussmann, L. E., I. M. Bussmann y E. H. Charreau. 1996. Role of receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factors I and II in the differentiation of rat mammary glands from lactogenesis I to lactogenesis II. *Journal of Reproduction and Fertility*, 107: 307-314.
- Caessens, P. W. J. R., H. H. J. De Jongh, W. Norde y M. Guerrero. 1999. The adsorption-induced secondary structure of  $\kappa$ -casein and of distinct parts of its sequence in relation to foam and emulsion properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1430: 73-83.
- Castro, F., A. Rodríguez, G. Juárez, F. M. Fernández. 2009. Aspectos comparativos de la determinación de la actividad lítica de la Lisozima. *Acta Zoológica Lilloana* 53 (1-2):.....
- Cavaletto, M., M. G. Giuffrida y A. Conti. 2004. The proteomic approach to analysis of human milk fat globule membrane. *Clinica Chimica Acta*, 347: 41-48.
- Cerioti, G., S. Chessa, P. Bolla, E. Budelli, L. Bianchi, E. Duranti y A. Caroli. 2004. Single nucleotide polymorphism in

- the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *Journal of Dairy Science*, 87: 2606-2613.
- Chakraborty, A. y S. Basak. 2008. Effect of surfactants on casein structure: A spectroscopic Study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63: 83-90.
- Chanat, E., P. Martin y M. Ollivier-Busquet. 1999.  $\alpha_{s1}$ -casein is required for the efficient transport of  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 112: 3399-3412.
- Chaturvedi, P., D. Warren, M. Altaye, A. L. Morrow, G. Ruiz Palacios, L. K. Pickering y D. S. Newburg. 2001. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology*, 11: 365-372.
- Chianese, L., R. Mauriello, N. Introchia y F. Addeo. 1997a. New  $\alpha_{s2}$ -casein variant from caprine milk. *Journal of Dairy Research*, 59: 299-305.
- Chianese, L., P. Ferranti, G. Garro, R. Mauriello y F. Addeo. 1997b. Occurrence of three novel  $\alpha_{s1}$ - casein variants in goat milk. IDF Seminar. Milk Protein Polymorphism, 259- 267. International Dairy Federation, Bruxelles, Belgium.
- Chianese, L., G. Garro, P. Ferranti, L. M. Speranza, F. Pilla, C. Bevilacqua y E. Pietrolà. 1998. Occurrence of new variant goat  $\alpha_{s1}$ - and  $\alpha_{s2}$ - casein in a breed of Southern Italy. 25<sup>th</sup> International Dairy Congress 82<sup>nd</sup> annual sessions, Aarhus.
- Chongqiu, J. y L. Luo. 2004. Lysozyme enhanced europium-meta-cycline complex fluorescence: a new spectrofluorimetric method for determination of lysozyme. *Analytica Chimica Acta*, 511: 11-16.
- Clare, D. A. y H. E. Swaisgood. 2000. Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83: 1187-1195.
- Corbacho, A. M., G. Martinez de la Escalera y C. Clapp. 2002. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormona/placental lactogen family in angiogenesis. *Journal of Endocrinology*, 173: 219-238.
- Csizmòk, V., Z. Dosztányi, I. Simon y P. Tompa. 2007. Towards proteomics approaches for the identification of structural disorder. *Current Protein and Peptide Science*, 8: 173-179.
- Curley, D. M., T. F. Kumosinski, J. J. Unruh y H. M. Farrell. 1998. Changes in secondary structure of bovine casein by

- Fourier transform infrared spectroscopy: effects of calcium and temperature. *Journal of Dairy Science*, 81: 3154-3162.
- Dalgleish, D. 1998. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *Journal of Dairy Science*, 81: 3013-3018.
- Day, I. N. M., X. Chen, T. R. Gaunt, T. H. T. King, A. Voropantov, S. Ye, S. Rodriguez, H. E. Syddall, A. A. Sayer, E. M. Dennison, F. Tabassum, D. J. P. Barker, C. Cooper y D. I. W. Phillips. 2004. Late life metabolic syndrome, early growth, and common polymorphism in the growth hormone and placental lactogen gene cluster. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89: 5569-5576.
- de Souza, S., J. Fu, B. A. States y E. B. Ziff. 2002. Differential palmitoylation directs the AMPA receptor-binding protein ABP to spines or to intracellular clusters. *The Journal of Neuroscience*, 22: 3493-3503.
- Dear, T. N., I. A. Ramshaw y R. F. Kefford. 1988. Differential expression of a novel gene, WDNM1, in nonmetastatic rat mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Research*, 48: 5203-5209.
- Denis, R. G. P., G. Williams y R. G. Vernon. 2003. Regulation of serum leptin and its role in hyperphagia of lactation in the rat. *Journal of Endocrinology*, 176: 193-203.
- Dettori, M. L., G. M. Vacca, V. Carcangiu, M. Pazzola y A. M. Rocchiagiani. 2009. A reliable method for characterization of the goat CSN1S1 E allele. *Livestock Science Article*, in press.
- Dev, B. C., S. Sood, S. De Wind y C. Slattery. 1994.  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -casein in human milk micelles: structural studies. *Archives of Biochemistry y Biophysics*, 314: 329-336.
- Dobson, D. E., E. M. Prager y A. C. Wilson. 1984. Stomach lysozymes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 258: 11607-11616.
- Doppler, W., S. Geymayer y H. Weirich. 2000. Synergistic interactions of transcription factors in the regulation of milk protein gene expression. *Biology of the Mammary Gland*. Springer US, pp. 139-146.
- Doppler, W., A. Villunger, P. Jennewein, K. Brduscha, B. Groner y R. K. Ball. 1991. Lactogenic hormone and cell type-specific of whey acidic protein gene promoter in transfected mouse cells. *Molecular Endocrinology*, 5: 1624-1632.

- Dove, P. 2000. Genetic polymorphisms in milk protein genes y their impact on milk composition. *Biology of the Mammary Gland*. Springer US, pp. 225-230.
- Duncan, J. S. y R. D. Burgoyne. 1996. Characterization of the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  depletion on synthesis, phosphorylation and secretion of casein in lactating mammary cells. *Biochemical Journal*, 317: 487-493.
- Duplus, E., M. Glorian y C. Forest. 2000. Fatty acid regulation of gene transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 30749-30752.
- Düringer, C., A. Hamiche, L. Gustafsson, H. Kimural y C. Svanborg. 2003. HAMLET interacts with histones and chromatin in tumor cell nuclei. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 42131-42135.
- Düring, K., P. Porsh, A. Mahn, O. Brinkmann y W. Gieffers. 1999. The non-enzymatic microbial activity of lysozyme. *FEBS Letters*, 449: 93-100.
- Edlund, A., T. Johansson, B. Leidbik, L. Hansson. 1996. Structure of the human kappa-casein gene. *Gene*, 174: 65-69.
- Egito, A. S., L. Miccio, C. López, A. Adam, J. M. Girardet y J. L. Gaillard. 2002. Separation and characterization of mares' milk  $\alpha_{s1}$ - $\beta$ -,  $\kappa$ -caseins,  $\gamma$ -casein-like, and proteose peptone component 5-like peptides. *Journal of Dairy Science*, 85: 697-706.
- Eigel, W. N., J. E. Butler, C. A. Erstrom, H. M. Farrel, V. R. Harwalker, R. Jenness y M. Whitney. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk. *Journal of Dairy Science*, 67: 1599-1631.
- Eisenthal, R. y M. J. Danson. 1993. *Enzyme Assays: A practical approach*. IRL Press. Oxford University Press, New York.
- Euber, J. R. y J. R. Brunner. 1982. Interaction of  $\kappa$ -casein with immobilized  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 65: 2384-2387.
- Farrel, H. M. y M. P. Thompson. 1988. The caseins of milk as calcium binding proteins. En: M. P. Thompson (ed.), *Calcium Binding Proteins*. CRC Press, Boca Raton. Florida, p. 117.
- Farrell, H. M., T. F. Kumosinski, P. H. Cooke, P. D. Hoagland, E. D. Wickham, J. J. Unru y M. L. Groves. 1999. Environmental influences on the particle sizes of purified  $\kappa$ -casein: metal effect. *International Dairy Journal*, 9: 193-199.

- Farrell, H. M., R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Butler, L. K. Creamer, C. L. Hicks, C. M. Hollar, K. Ng-Kwai-Hang y H. E. Swaisgood. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87: 1641-1674.
- Fast, J., A. Mosseberg, C. Svanborg y S. Linse. 2005. Stability of HAMLET a kinetically trapped  $\alpha$ -lactalbumin oleic acid complex. *Protein Science*, 14: 329-340.
- Faulkner, A. y M. Peaker. 1987. Regulation of mammary glucose metabolism in lactation. En: M. C. Neville y H. Daniel (eds.), *Mammary gland: development, regulation and function*. Plenum Press, pp. 535-562.
- Fedorov, A., S. Roy, L. Fedorova y W. Gilbert. 2002. Mystery of intron gain. *Genoma Research*, 13: 2236-2241.
- Fedorov, A., L. Fedorova, V. Starshenko, V. Filatov y E. Grigorev. 1998. Influence of exon duplication on intron and exon phase distribution. *Journal of Molecular Evolution*, 46: 263-271.
- Fedorov, A., X. Cao, S. Saxonov, S. De Souza, S. W. Roy y W. Gilbert. 2001. Intron distribution difference for 276 ancient and 131 modern genes suggests the existence of ancient introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 13177-13182.
- Feng, Z., A. Marti, B. Jehn, H. J. Altermatt, G. Chicaiza y R. Jaggi. 1995. Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. *The Journal of Cell Biology*, 131: 1095-1103.
- Fernández, F. M. 2006. Mecanismos de regulación de variables fisiológicas sistémicas. *Opera Lilloana*, Fundación Miguel Lillo, vol. 46, 209 pp.
- Fernández, F. M. y S. Saad de Schoos. 1999. Funciones de los componentes de la leche. Un enfoque biológico. *Opera Lilloana*, Fundación Miguel Lillo, vol. 44, 164 pp.
- Ferretti, L., P. Leone y V. Sgaramella. 1990. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Research*, 18: 6829-6833.
- Feuermann, Y., S. J. Mabeesh y A. Shamay. 2004. Leptin affects prolactin action on milk protein and fat synthesis in bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 87: 2941-2946.
- Fiat, A. M. y P. Jolles. 1989. Caseins of various origins and biolo-

- gically active peptides and oligosaccharides. Structure and physiological aspects. *Journal of Molecular and Cellular Biochemistry*, 87: 5-30.
- Fox, P. F. 1982. The milk protein system. En: P. F. Fox (ed.), *Developments in Dairy Chemistry*. Applied Science Publishers.
- Fuxreiter, M., P. Tompa y I. Simon. 2007. Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs. *Bioinformatics*, 23: 950-956.
- Gallagher, D., P. F. Cotter y D. Mulvihill. 1997. Porcine milk proteins: a review. *International Dairy Journal*, 7: 99-118.
- Gandhe, A. S., G. Janardhan y J. Nagaraju. 2007. Immune upregulation novel antibacterial proteins from silkworms (Lepidoptera) that resemble lysozyme but lack muramidase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 655-666.
- Ginalski, K., N. V. Grishin, A. Godzik y L. Rychlewski. 2005. Practical lessons from protein structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 33 :1874-1891.
- Groenen, M. A. M., R. J. M. Dijkhoj, A. J. M. Verstage, J. J. van del Poel. 1993. The complete sequence of the gene encoding bovine  $\alpha_{S2}$ - casein. *Gene*, 123: 187-193.
- Groneberg, D. A., F. Döring, S. Theis, M. Nickolaus, A. Fischer y H. Daniel. 2002. Peptide transport in mammary gland: expression and distribution of PEPT2 mRNA and protein. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 282: E1172-E1179.
- Grosclaude, F., M. F. Mahé, G. Brignon, L. Di Stasio y R. Junet. 1987. A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat  $\alpha_{S1}$ - casein. *Genetics, Selection, Evolution*, 19: 399-412.
- Grosclaude, F., G. Ricordeau, P. Martin, F. Remeuf, L. Vassal y J. Bouillon. 1994. Du gène au fromage : le polymorphisme de la caseine  $\alpha_{S1}$  caprine, ses effets, son évolution. *Productions Animales*, 7: 3-19.
- Groves, M. L., W. G. , Gordon. 1970. The major components of human casein. A protein phosphorylated at different levels. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 140: 47-51.
- Groves, M. L., H. J. Dower y H. M. Farrell. 1999. Reexamination of the polymeric distributions of  $\kappa$ -casein isolated from bovine milk. *Journal of Protein Chemistry*, 11: 21-28.

- Guyette, W. A., R. J. Matusik y J. M. Rosen. 1979. Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. *Cell*, 17: 1013-1023.
- Hajjoubi, S., S. Rival-Gervier, H. Hayes, S. Floriot, A. Eggen, F. Piumi, P. Chardon, L. M. Houdebine y D. Thépot. 2006. Ruminants genome no longer contains *Whey Acidic Protein* gene but only a pseudogene. *Gene*, 370: 104-112.
- Hakansson, A., B. Zhivotovsky, S. Orrenius y H. Sabharwal. 1995. Apoptosis induced by human milk protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 8064-8068.
- Hall, L., R. K. Craig, M. S. Davies, D. N. Ralphs y P. N. Campbell. 1981.  $\alpha$ -Lactalbumin is not marker of human hormone-dependent breast cancer. *Nature*, 290: 602-604.
- Hallen, E., T. Allmere, J. Náslund, A. Andrén y A. Lundén. 2007. Effect of genetic polymorphism of milk proteins on rheology of chymosin-induced milk gels. *International Dairy Journal*, 17: 791-799.
- Hamosh, M. 1995. Enzymes in human milk. En: R. G. Jensen (ed.), *Handbook of Milk Composition*. Academic Press, pp. 388-427.
- Hansson, L., A. Edlung, T. Johansson, O. Hernell, M. Stromqvist, S. Lindquist, B. Lönnerdal y S. Bergstrom. 1994. Structure of the human beta-casein encoding gene. *Gene*, 139: 193-199.
- Helles, G. 2008. A comparative study of the reported performance of *ab initio* protein structure prediction algorithms. *Journal of the Royal Society Interface*, 5: 387-396.
- Hendry, K. A. K., K. R. Simpsom y C. O. Wilde. 1998. Autocrine inhibition of milk secretion in the lactating tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Journal of Molecular, Endocrinology*, 21: 169-177.
- Herman, A., C. Bignon, N. Daniel, J. Grosclaude y A. Gertler. 2000. Functional heterodimerization of prolactin and growth hormone receptors by ovine placental lactogen. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 6295-6301.
- Hernández, M. B. 2008. Estudio sobre oligómeros de caseína: Aspectos comparativos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales e IML, Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.
- Hernández, M. B., S. Saad de Schoos, E. Casanave, F. M. Fernandez, M. Uhart y A. Vila. 2001. Polímeros de caseína en

- la leche de varias especies de mamíferos. *Mastozoología Neotropical*, 8: 15-20.
- Holt, C. 1998. Casein micelles substructure and calcium phosphate interactions studied by sephacryl column chromatography. *Journal of Dairy Science*, 81: 2994-3003.
- Hooper, K. L., B. Joneja, H. B. White y C. Thorpe. 1996. A Sulphydryl-oxidase from chicken egg white. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 30510-30516.
- Hooper, K. L., S. Sheasley, H. Gilbert y C. Thorpe. 1999. Sulphydryl-oxidase from egg white. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 22147-22150.
- Horseman, N. D. y J. D. Buntin. 1995. Regulation of pigeon cropmilk secretion and parental behaviors by prolactin. *Annual Reviews of Nutrition*, 15: 213-238.
- Hou, Z., J. P. Bailey, A. J. Vomachka, M. Matsuda, J. A. Lockfeer y N. D. Horseman. 2000. Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1 (GlyCAM 1) is induced by prolactin and suppressed by progesterone in mammary epithelium. *Endocrinology*, 141: 4278.
- Houdebine, L. M., J. Djiane, I. Dusanter-Fourt, P. Martel, P. A. Kelly, E. Devinoy y J. L. Servely. 1985. Hormonal action controlling mammary activity. *Journal of Dairy Science*, 68: 489-500.
- Hovey, R., J. Harris, D. L. Hadsell, A. V. Lee, C. J. Ormady y B. K. Vonderhaar. 2003. Local insulin-like growth factor-II mediates prolactin-induced mammary gland development. *Molecular Endocrinology*, 17: 460-471.
- Humphreys, R. C., J. Lydon, B. W. O'Malley y J. M. Rosen. 1997. Mammary gland development is mediated by both stromal and epithelial progesterone receptors. *Molecular Endocrinology*, 801.
- Hynes, N. E., D. Tavema, I. M. Hanverth, F. Ciardello, D. S. Salomon, T. Yamamota y B. Groner. 1990. Epidermal growth factor receptor, but not c-erbB-2 activation, prevents lactogenic hormone induction of the  $\beta$ -casein gene in mouse mammary epithelial cells in culture. *Molecular Cell Biology*, 10: 4027-4034.
- Iametti, S., G. Tedeschi, E. Oungre y F. Bonomi. 2001. Primary structure of  $\kappa$ -casein isolated from mares milk. *Journal of Dairy Research*, 68: 53-61.
- Iametti, S., F. Sessa, F. Bonomi, G. F. Greppi, M. Feligni y G.

- Enne. 1997. Biochemical methods for the characterization of mare and donkey casein. International Dairy Federation, special issue: 268-274.
- Ibrahim, H. R., T. Matsuzaki y T. Aoki. 2001. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. FEBS Letters, 506: 27-32.
- Imagawa, W. y V. K. Pedchenko. 2001. *In vivo* inhibition of keratinocyte growth factor receptor expression by estrogen and antagonism by progesterone in the mouse mammary gland. Journal of Endocrinology, 171: 319-327.
- Jackson, T., D. M. Koterwas, M. Morgan y A. P. Bradford. 2003. Fibroblast growth factors regulate prolactin transcription via an atypical rac-dependent signaling pathway. Molecular Endocrinology, 17: 1921-1930.
- Jaje, J., H. N. Wolcott, O. Fadugba, D. Cripps, A. J. Yang, I. H. Mathe y C. Thorpe. 2007. A flavin-dependent sulfhydryl oxidase in bovine milk. Biochemistry, 46(45): 13031
- Janolino, V. y H. E. Swaisgood. 1975. Isolation and characterization of sulfhydryl-oxidase from bovine milk. Journal of Biological Chemistry, 250: 2532-2538.
- Jansà-Pèrèz, M., C. Leroux, A. Sanchez Bonastre, P. Martin. 1994. Occurrence of a *LINE* sequence in the 3'UTR of the goat  $\alpha_{S1}$ -casein E allele associated with a reduced protein synthesis. Gene, 147: 179-187.
- Jeichitra, V., N. Kandasamy y S. Panneerselvam. 2003. Milk protein polymorphism in Kangayam cattle. Tropical Animal Health and Production, 35: 147-153.
- Jenness, R. 1982. Inter-species comparison of milk proteins. En: P. F. Fox (ed.), Development in Dairy Chemistry. Applied Science, pp. 87-114.
- Jensen, M., y O. G. Mouritsen. 2004. Lipids do influence protein function-the hydrophobic matching hypothesis revisited. Biochimica et Biophysica Acta, 1666: 205-226.
- Jensen, R. G. 2002. Invited Review: The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. Journal of Dairy Science, 85: 295-350.
- Jensen, R. G., B. Blanc y S. Patton. 1995. The structure of milk: Implications for sampling and storage. B. Particulated Constituents in human and bovine milk. En: R. G. Jensen (ed.), Handbook of Milk Composition. Academic Press, pp. 50-62.

- Jensen, R. G., A. M. Ferris, C. J. Lammi-Keefe y R. A. Henderson. 1990. Lipids of bovine and human milks: A comparison. *Journal of Dairy Science*, 73: 223-240.
- Jenzano, J. W., S. L. Hogan y R. L. Lundblad. 1986. Factors influencing human salivary lysozyme in lysoplate and turbidimetric assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(6): 963-967.
- Jimenez-Cantizano, R. M., C. Infante, B. Martin-Antonio, M. Ponce, I. Hachero, J. L. Navas y M. Manchado. 2008. Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozyme in brill (*Scophthalmus rhombus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 57-65.
- Johansson, B. y M. Svennrholm. 1956. The content of carbohydrates in caseins from different species. *Acta Physiologica Scandinavica*, 37: 324-329.
- Johnsen, L. B., L. K. Rasmussen, T. E. Petersen y L. Berglund. 1995. Characterization of three types of human  $\alpha_{s1}$ -casein mRNA transcripts. *Biochemical Journal*, 309: 237-242.
- Johnston, S. L., K. E. Kitson, J. W. Tweedie, S. R. Davis y J. Lee. 2004.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase inhibition suppresses milk protein synthesis in isolated ovine mammary cells. *Journal of Dairy Science*, 87: 321-329.
- Jolivet, G., E. Devenoy, M. L. Fontaine, L. M. Houdebine. 1992. Structure of the gene encoding rabbit alpha s1 casein. *Gene*, 113: 257-262.
- Jollès, P. y J. Jollès. 1984. What's new in lysozyme research? *Molecular and Cellular Biochemistry*, 63: 165-189.
- Jollès, P., M. Loucheux-Lefebvre y A. Henschen. 1978. Structural relatedness of  $\kappa$ -casein and fibrinogen  $\gamma$ -casein. *Journal of Molecular Evolution*, 11: 271-277.
- Jones, W. K., L. Y. Yu-Lee, S. M. Clift, T. L. Brown, J. M. Rosen. 1985. The rat casein multigene family. Fine structure and evolution of the  $\beta$ -casein gene. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 7042-7050.
- Kawasaki, K. y K. M. Weiss. 2003. Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 4060-4065.
- Kawasaki, K., T. Suzuki y K. M. Weiss. 2004. Genetic basis for the evolution of vertebrate mineralized tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 11356-11361.

- Keenan, T. W. 2001. Milk lipid globules and their surrounding membrane: A brief history and perspectives for future research. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 6: 365-371.
- Keenan, T. W. y S. Patton. 1995. The structure of milk: Implications for sampling and storage. En: R. G. Jensen (ed.), *Handbook of Milk Composition*. Academic Press, New York, pp. 5-85.
- Kemp, T. S. 2005. *The Origin and Evolution of Mammals*. Oxford University Press, New York.
- Kimball, S. R., L. M. Shantz, R. L. Horetzky y L. S. Jefferson. 1999. Leucine regulates translocation of specific mRNAs in L6 myoblast through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 11647-11652.
- Klein, N., A. Schwertmann, M. Peters, C. Kunz y S. Strobe. 2000. Immunomodulatory effects of breast milk oligosaccharides. En: B. Koletzko (ed.), *Short and Long Term Effects of Breast Feeding on Child Health*. Plenum Publishers, New York, p. 251.
- Koczan, D., G. Hobom, y H. M. Seyfert. 1991. Genomic organization of the bovine  $\alpha_{S1}$ -casein gene. *Nucleic Acids Research*, 19: 5591-5596.
- Koenig, H. L., W. H. Gong y P. Pelissier. 2000. Rol of progesterone in peripheral nerve repair. *Reviews of Reproduction*, 5: 189-199.
- Kolb, A. 2003. The first intron of the murine  $\beta$ -casein gene contains a functional promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306: 1099-1105.
- Kumosinski, T. F., E. M. Brown y H. M. Farrell. 1991. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins:  $\alpha_{S1}$ -casein. *Journal of Dairy Science*, 74: 2889-2895.
- Kumosinski, T. F., E. M. Brown y H. M. Farrell. 1993a. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: a refined, energy-minimized  $\kappa$ -casein structure. *Journal of Dairy Science*, 76: 2507-2520.
- Kumosinski, T. F., E. M. Brown y H. M. Farrell. 1993b. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: an energy-minimized  $\beta$ -casein structure. *Journal of Dairy Science*, 76: 931-945.

- Kunz, C. L. y B. Lönnerdal. 1990. Human-milk proteins: analysis of casein and subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. *American Journal of Clinical Nutrition*, 51: 37-46.
- Laegrid, A., A. B. K. Otnaess y J. Fuglesang. 1986. Human and bovine milk: Comparison of ganglioside composition and enterotoxin-inhibitory activity. *Pediatric Research*, 20: 416.
- Lea, R. G., P. Wooding, I. Stewart, L. T. Hannah, S. Morton, K. Wallace, R. O. Atiken, J. S. Milne, T. R. Regnault, R. V. Anthony y J. M. Wallace. 2007. The expression of ovine placental lactogen, StAR and progesterone-associated steroidogenic enzymes in placentae of overnourished growing adolescent ewes. *Reproduction*, 133: 785-796.
- Leroux, C., N. Mazure y P. Martin. 1992. Mutations away from splice site recognition sequences might *cis* -modulate alternative splicing of goat  $\alpha_{S1}$ - casein transcripts. Structural organization of the relevant gene. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 6147-6157.
- Lister, I. M. B., L. K. Rasmussen, L. B. Johnsen, L. Moller, T. E. Petersen y E. S. Sorensen. 1998. The primary structure of caprine PP3: amino acid sequence, phosphorylation, and glycosylation of component PP3 from the proteose-peptone fraction of caprine milk. *Journal of Dairy Science*, 81: 2111-2115.
- Loughran, N. B., B. O'Connor, C. O'Fágáin y M. J. O'Connell. 2008. The phylogeny of the mammalian heme peroxidases and the evolution of their diverse functions. *Evolutionary Biology*, 8: 101.
- Mackie, R. 2002. Mutualist fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 319-326.
- Malkoski, M., S. G. Dashper, N. M. O'Brien-Simpson, G. H. Talbo, M. Macris, K. Cross y E. C. Reynolds. 2001. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2309-2315.
- Martin, M. 1990. The latex of *Hevea brasiliensis* contains high levels of both chitinases and chitinases/lysozymes. *Plant Physiology*, 95: 469-475.
- Martín, M. J., S. Martín-Sosa, L. A. García-Pardo y P. Hueso. 2001. Distribution of bovine milk sialoglycoconjugates during lactation. *Journal of Dairy Science*, 84: 995-1000.

- Martin, P. 1993. Polymorphisme génétique des lactoprotéines caprines. *Lait*, 73: 511-532.
- Martin, P., M. Ollivier-Bousquet, F. Grosclaude. 1999. Genetic polymorphism of caseins: A tool to investigate casein micelle organization. *International Dairy Journal*, 9: 163-171.
- Mather, I. H. 1987. Protein of milk fat globule membrane as markers of mammary epithelial cells and apical plasma membrane. En: M. C. Neville y H. Daniel (eds.), *The Mammary Gland: Development, Regulation and Function*. Plenum Press, New York, pp. 217-258.
- Mather, I. H. 2000. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *Journal of Dairy Science*, 83: 203-247.
- Mc Kenzie, H. A. y F. White. 1986. Determination of lysozyme activity at low levels with emphasis on the milk enzyme. *Analytical Biochemistry*, 157: 367-374.
- Mc Lean, D. y J. Schaar. 1989. Effects of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -casein genetics variants and concentration on sineresis of gels from renneted mated milk. *Journal of Dairy Research*, 56: 297-301.
- Medina de Cáceres, M. 2008, Tesis Doctoral. Estudio de las proteínas del lactosuero de llama, vicuña y alpaca. Facultad de Ciencias Naturales e IML. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- Mercier, J. C. 1981. Phosphorylation of casein present evidence for an amino acid triplet code posttranslationally recognized by specific kinases. *Biochimie*, 63: 1-17.
- Mercier, J. C. y J. L. Vilotte. 1993. Structure and function of milk protein genes. *Journal of Dairy Science*, 76: 3079-3098.
- Moatsou, G., E. Moschopoulou, D. Mollé, V. Gagnaire, I. Kandarakis y J. Léonil. 2008. Comparative study of the protein fraction of goat milk from the Indigenous Greek breed and from international breeds. *Food Chemistry*, 106: 509-520.
- Moreno, F. J., I. Recio, A. Olano y R. López-Fandiño. 2000. Cromatografic characterization of bovine  $\kappa$ -casein macropeptide. *Journal of Dairy Research*, 67: 349-359.
- Moshel, Y., R. E. Rhoads y I. Barash. 2006. Role of amino acids in translational mechanisms governing milk protein synthesis in murine and ruminant mammary epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98: 685-700.

- Mulac-Jericevic, B., J. P. Lydon, F. J. De Mayo y O. M. Conneely. 2003. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 100.
- Mulholland, D. J., S. Dedhar, G. A. Coetzee y C. C. Nelson. 2005. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/ $\beta$ -Catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocrine Reviews*, 26: 898-915.
- Nakamura, T., H. Kawase, K. Kimurat, Y. Watanabe y M. Ohtani. 2003. Concentrations of sialyloligosaccharides in bovine colostrum and milk during the prepartum and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 86: 1315-1320.
- Neville, M. C. 1995. Lactogenesis in women: A cascade of events revealed by milk composition. En: R. G. Jensen (ed.), *The Composition of Milk*. Academic Press, pp. 87-98.
- Neville, M. C. 2005. Calcium secretion into milk. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10:119.
- Neville, M. C., T. B. McFadden y I. Forsyth. 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7: 49.
- Newburg, D. S., G. Ruiz Palacios, M. Altaye, P. Chaturvedi, J. Meinzen-Derr, M. Guerrero y A. L. Morrow. 2004. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology*, 14: 253-263.
- Nielsen, N. C., M. H. Andersen, P. Mabhout, L. Berglund, T. E. Petersen y L. K. Rasmussen. 1999. Isolation of adipophilin and butyrophilin from bovine milk and characterization of cDNA encoding adipophilin. *Journal of Dairy Science*, 82: 2543-2549.
- O'Brien, P. J. y R. R. Colwell. 1987. A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1718-1720.
- Oettgen, P. 2006. Regulation of vascular inflammation and remodeling by ETS factors. *Circulation Research*, 99: 1159-1166.
- Oftedal, O. T. 1984. Milk compositions, milk yield and energy output at peak lactation: Comparative review. En: M. Peaker, R. G. Vernon y C. H. Knight (eds.), *Physiological Strategies in Lactation*. Academic Press, pp. 33-85.

- Oftedal, O. T. 2002a. The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7: 225.
- Oftedal, O. T. 2002b. The origin of lactation as a water source for parchment-shelled eggs. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7: 253.
- Ould Eleya, M. M., S. Desobry Banon y J. Hardy. 1995. A comparative study of pH and temperature effects on the acidic coagulation of milks from cows, goats, and sheeps. *Journal of Dairy Science*, 78: 2675-2682.
- Parry, R. y R. J. Carrol. 1969. Location of  $\kappa$ -casein in milk micelles. *Biochemical and Biophysical Acta*, 194: 138.
- Peaker, M. 2002. The mammary gland in mammalian evolution: a brief commentary on some of the concepts. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7: 347.
- Pepper, L., y H. M. Farrell. 1982. Interactions leading to formation of casein submicelles. *Biochemical and Biophysical Acta*, 194: 138.
- Phadungath, C. 2005. Casein micelles structure: a concise review. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 27: 201-212.
- Polgar, N., B. Fogelgren, J. M. Shipley y K. Csiszar. 2007. Lysyl oxidase interacts with hormone placental lactogen and synergistically promotes breast epithelial cell proliferation and migration. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 3262-3272.
- Prinzenberg, E., K. Gutscher, S. Chessa, A. Caroli y G. Erhardt. 2005. Caprine  $\kappa$ -casein (*CSN3*) polymorphism: new developments in molecular Knowledge. *Journal of Dairy Science*, 88: 1490-1498.
- Prosinecki, V., P. F. N. Faisca y C. M. Gomes. 2007. Conformational states and protein stability from a proteomic perspective. *Currents Proteomics*, 4: 44-52.
- Provot, C., M. A. Persuy y J. C. Mercier. 1995. Complete sequence of the ovine beta-casein-encoding gene and interspecies comparison. *Gene*, 154: 259-263.
- Qasba, P. K., y S. Kumar. 1997. Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 255-306.
- Qi, P. X., E. D. Wickham, E. G. Piotrowski, C. K. Fagerquist y H. M. Farrell. 2005. Implication of C-Terminal deletion on

- the structure and stability of bovine  $\beta$ -casein. *The Protein Journal*, 24: 431.
- Rabasa de Sal Paz, A., A. Fanjul y F. M. Fernández. 1983. Polimorfismo genético de  $\kappa$ -caseína y concentración de proteínas lácteas en ganado bovino criollo. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 20: 63-76.
- Ramos, P., A. Martín-Hidalgo y E. Herrera. 1999. Insulin-induced up-regulation of lipoprotein lipase messenger ribonucleic acid activity in mammary gland. *Endocrinology*, p. 140.
- Ramunno, L., G. Cosenza, A. Rando, R. Illario, G. Gallo, D. Di Bernardino y P. Masino. 2004. The goat  $\alpha_{s1}$ -casein gene: gene structure and promoter analysis. *Gene*, 334: 105-111.
- Ramunno, L., G. Cosenza, A. Rando, A. Pauciullo, R. Illario, D. Gallo, D. Di Bernardino y P. Masina. 2005. Comparative analysis of gene of goat CSN1S1 F and N alleles and characterization of CSN1S1 transcrip variants in mammary gland. *Gene*, 345: 289-299.
- Rando, A., P. Di Gregorio, L. Ramunno, P. Mariani, A. Fiorella, C. Senese, D. Marletta y P. Masina. 1998. Characterization of the CSN1A<sup>G</sup> allele of the bovine  $\alpha_{s1}$ -casein locus by the insertion of a relict of a log interspersed element. *Journal of Dairy Science*, 81: 1735-1742.
- Rasmussen, L. K. y T. E. Petersen. 1991. Purification of disulphide-linked  $\alpha_{s2}$ -casein and  $\kappa$ -casein from bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 58: 193.
- Rasmussen, L. K., H. A. Due y T. E. Petersen. 1995. Human  $\alpha_{s1}$ -casein: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111B: 75-81.
- Rasmussen, L. K., E. S. Sorensen, T. E. Petersen, N. C. Nielsen y J. K. Thomsen. 1997. Characterization of phosphate sites in native ovine, caprine and bovine casein micelles and their caseinomacropetides: A solid-state phosphorus-31 nuclear magnetic resonance and sequence and Mass Spectrometric study. *Journal of Dairy Science*, 80: 607-614.
- Rasmussen, L. K., L. B. Johnsen, A. Tsiora, E. S. Sorensen, J. K. Thomsen, N. C. Nielsen, H. J. Jakobsen y T. E. Petersen. 1999. Disulphide-linked casein and casein micelles. *International Dairy Journal*, 9: 215-218.
- Recio, I., M. L. Pérez-Rodríguez, M. Ramos, L. Amigo. 1997. Capillary electrophoretic análisis of genetic variants of milk

- proteins from different species. *Journal of Chromatography A*, 768: 47-56.
- Reichardt, H. M., K. Horsch, H. J. Gröne, A. Kolbus, H. Beug, H. Hayes y G. Schütz. 2001. Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities. *European Journal of Endocrinology*, 145: 519-527.
- Rhoads, R. E. y E. Grudzien-Nogalska. 2007. Translational regulation of milk protein synthesis at secretory activation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12: 283-292.
- Rijnkels, M. 2002. Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7: 327-345.
- Robenek, H., O. Hofnagel, I. Buers, S. Lorwski, M. Schnoor, M. J. Robenek, H. Heid, D. Troyer y N. J. Severs. 2006. Butyrophilin controls milk fat globule secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 10385-10390.
- Roberts, B. T., P. Ditullio, J. Vitale, K. Hehir y K. Gordon. 1993. Cloning of the goat  $\beta$ -casein-encoding gene and expression in transgenic mice. *Gene*, 121: 255-262.
- Robinson, G. W., L. Hennighausen y P. Johnson. 2000. Side-branching in the mammary gland: The progesterone-Wnt connection. *Genes & Development*, 14: 889-894.
- Robitaille, G., N. G. Kwai-Hang y H. Monardes. 1991. Variation in the N-acetylneuraminic acid content of bovine  $\kappa$ -casein. *Journal of Dairy Research*, 58: 107-114.
- Ronayne, P. A. y M. E. Sambucetti. 1993. Casein to whey protein ratio in rat and human milks: Effects of maternal protein intake. *Journal of Dairy Science*, 76: 1645-1653.
- Ronayne, P. A., A. Baroni, M. E. Sambucetti, N. E. López y J. M. Ceriani Cernadas. 2000. Lactoferrin levels in term and preterm milk. *Journal of the American College of Nutrition*, 19: 370-373.
- Rosen, J. M. 1987. Milk protein gene structure and expression. En: M. C. Neville y H. Daniel (eds.), *The Mammary Gland*. Plenum Press, pp. 301-320.
- Ruan, W., M. E. Monaco y D. L. Kleinberg. 2005. Progesterone stimulates mammary gland ductal morphogenesis by synergizing and enhancing insulin-like growth factor- I action. *Endocrinology*, 146: 1170-1178.
- Ruiz de Bigliardo, G., M. E. Pérez, M. Hernández y F. M. Fer-

- nández. 2007. Polimorfismo de  $\alpha_{s1}$  Caseína de vicuña (*Vicugna vicugna*). Acta Zoológica Lilloana, 51: 161-163.
- Rutherford, K. J. y H. S. Gill. 2000. Peptides affecting coagulation. British Journal of Nutrition, 84: S99-S102.
- Saad de Schoos, S., G. Oliver y F. M. Fernandez. 1999. Relationship between lactoperoxidase system components in Creole goat milk. Small Ruminant Research, 32: 69-75.
- Saad de Schoos, S., F. M. Fernández, M. Uhart, M. Lewis, C. Campagna, M. Medina y A. Vila. 2002. Primer estudio comparativo de  $\gamma$ -glutamyltransferasa en leche de mamíferos y su relación con el tenor graso. Acta Zoologica Lilloana, 47: 85-91.
- Shekar, P. C., S. Goel, S. Deepa Rani Selvi, D. Partha Sarathi, J. Liza Alex, S. Singh y S. Kumar. 2006.  $\kappa$ -Casein-deficient mice fail to lactate. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103: 8000-8005.
- Shennan, D. B. y M. Peaker. 2000. Transport of milk constituents by the mammary gland. Physiological Reviews, 80: 925-945.
- Shetty, S., K. B. Bharnthi, S. N. Shenoy y S. N. Hedge. 1992. Biochemical properties of pigeon milk and its effects on growth. Journal of Biochemistry Physiology B, 162: 632-636.
- Shewale, J., S. K. Sinha y K. Brew. 1984. Evolution of  $\alpha$ -lactalbumins. The Journal of Biological Chemistry, 259(8): 4947-4956.
- Silva, L. F. P., M. J. VandeHaar, M. S. Weber Nielsen y G. W. Smith. 2002. Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland. Journal of Dairy Science, 85: 3277-3286.
- Slattery, C. 1978. Variation in glycosylation pattern of bovine  $\kappa$ -casein with micelle size and its relationship to a micelle model. Biochemistry, 17: 1100-1104.
- Sood, S. y C. Slattery. 2001. Association of mixtures of the two major forms of  $\beta$ -Casein from human milk. Journal of Dairy Science, 84: 2163-2169.
- Sood, S., Z. Chang y C. Slattery. 1992. Interactions properties of doubly phosphorylated  $\kappa$ -casein: A mayor component of the human milk caseins. Journal of Dairy Science, 75: 2945.
- Sood, S., G. Erickson y C. Slattery. 2003.  $\kappa$ -Casein interactions in suspension of the two major calcium-sensitive human  $\beta$ -casein. Journal of Dairy Science, 86: 2269-2275.

- Sörensen, E., L. Meller, M. Vinther, T. E. Petersen y L. Rasmussen. 2003. The phosphorylation pattern of human  $\alpha_{S1}$ -casein is markedly different from the ruminant species. *European Journal of Biochemistry*, 270: 3651-3655.
- Sprong, R. C., M. F. E. Hulstein y R. V. Van der Meer. 2001. Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 1298-1301.
- Suibroto, T., S. Sufiati y J. J. Beintema. 1999. Papaya (*Carica papaya*) lysozyme is a member of the family 19 (Basic, Class II) chitinases. *Journal of Molecular Evolution*, 49: 819-821.
- Svensson, M., J. Fast, A. Mosseberg, C. Düringer, L. Gustafsson, O. Hallgren, C. L. Brooks, L. Berliner, S. Linse y C. Svanborg. 2003.  $\alpha$ -Lactalbumin unfolding is not sufficient to cause apoptosis, but is required for the conversion to HAMLET (human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells). *Protein Science*, 12: 2794-2804.
- Swaigood, H. E. y H. R. Horton. 1987. Sulfhydryl-oxidase from milk. *Methods in Enzymology*, 143: 504-510.
- Talbot, B. y D. F. Waugh. 1970. Micelle-forming characteristics of monomeric and covalent polymeric  $\kappa$ -caseins. *Biochemistry*, 9: 2807-2813.
- Tompa, P., M. Fuxreiter, C. J. Oldfield, I. Simon, A. K. Dunker y V. N. Uversky. 2009. Close encounters of the third kind: disordered domains and the interactions of proteins. *BioEssays*, 31: 328-335.
- Tsai, C. S. 1997. Molecular modeling studies of lysozyme catalyzed hydrolysis of synthetic substrates. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29: 325-334.
- Tyagi, A., R. Khushiramani, R. Karunasagar y I. Karunasagar. 2007. Antivibrio activity of recombinant lysozyme expressed from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 272: 246-253.
- Vacca Smith, A. M. y W. H. Bowen. 2000. The effects of milk and  $\kappa$ -casein on salivary pellicle formed on hidroxyapatite disc in situ. *Caries Research*, 34: 88-93.
- Vanselow, J., W. Yang, J. Herrmann, H. Zerbe, H. Schuberth, W. Petzi, W. Tomek y H. Seyfert. 2006. DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the  $\alpha_{S1}$ -casein promoter is associated with abrupt shutdown of  $\alpha_{S1}$ -casein synthesis during acute mastitis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 37: 463-477.

- Vasbinder, A. J., H. S. Rollema y C. G. de Kruif. 2003. Impaired rennetability of heated milk; study of enzymatic hydrolysis and gelation kinetics. *Journal of Dairy Science*, 86: 1548-1555.
- Walstra, P. y R. Jenness. 1989. *Química y Física Lactológica*. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Weber, M. S., S. Purup, M. Vestergaard, R. M. Akers y K. Sejr-sen. 2000. Regulation of local synthesis of insulin-like growth factor-I and binding proteins in mammary tissue. *Journal of Dairy Science*, 83: 30-37.
- White, F., D. L. Blackwill, D. A. Meeter y K. K. Merchant. 1993. Further studies on lysozyme-like activity of  $\alpha$ -lactalbumin: Development of alternative methods of assays. *Analytical Biochemistry*, 212: 263-268.
- Wilde, C. J., C. V. P. Addey, L. M. Boddy y M. Peaker. 1995. Autocrine regulation of milk secretion by a protein milk. *Biochemical Journal*, 305: 51-58.
- Williams, V., H. Sabharwal y M. Jhanwar-Uniyal. 2004. Multimeric alpha-lactalbumin induces apoptosis in breast cancer cells. *American Association of Cancer Research*, 45: 735.
- Wodward, T. L., J. Xie, J. L. Fendrick y S. Z. Haslam. 2000. Proliferation of mouse mammary epithelial cells *in vitro*: interactions among epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, ovarian hormones, and extracellular matrix proteins. *Endocrinology*, 141: 3586.
- Xiao, X. Q., K. L. Grove, B. E. Grayson y M. S. Smith. 2004. Inhibition of uncoupling protein expression during lactation role of leptin. *Endocrinology*, 145: 830-838.
- Xue, Q. G., N. Itoh, K. L. Schey, Y. L. Li, R. K. Cooper y J. F. La Peyre. 2007. A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of *i*-type lysozymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64: 82-95.
- Yahyaoui, M. H., A. Angiolillo, F. Pilla, A. Sánchez y J. M. Folch. 2003. Characterization and genotyping of the caprine  $\kappa$ -casein variants. *Journal of Dairy Science*, 86: 2715-2720.
- Yamada, H., K. Takamori y H. Ogawa. 1987. Localization and some properties of skin sulfhydryl-oxidase. *Archives of Dermatological Research*, 279: 194-197.
- Yamada, H., Y. Suga, K. Takamori y H. Ogawa. 1994. Stoichiometry of the reaction catalysed by skin sulfhydryl-oxidase. *Journal of Dermatology*, 21: 394-396.

- Yang, J., J. J. Kennelly y V. E. Baracos. 2000. The activity of transcription factor Stat5 responds to prolactin, growth hormone, and IGF-I in rat and bovine mammary explant culture. *Journal of Animal Science*, 78: 3114-3125.
- Yang, X., W. H. Lee, F. Sobot, E. Papagiorgiourou, C. V. Robinson, G. Grossmann, M. Sundström, D. A. Doyle y J. M. Elkins. 2006. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 17237-17242.
- Yang, Y. y K. Hamaguchi. 1980. Hidrolysis of 4-umbilliferyl N-acetyl-chitotrioside catalyzed by hen and turkey lysozyme. *Journal of Biochemistry*, 87: 1003-1014.
- Yoshimura, M. y T.Oka. 1990. Transfection of  $\beta$ -casein chimeric gene and hormonal induction of its expression in primary murine mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 3670-3674.
- Yu, S., L. Zheng, S. L. Asa y S. Ezzat. 2002. Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) mediates signaling to the prolactin but not the FGFR4 promoter. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 283: E490-E495.
- Zhang, X., X. Fu, H. Zhang, C. Liu, W. Jiao y Z. Chang. 2005. Chaperone-like activity of  $\beta$ -casein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37: 1232-1240.
- Zhao, S. J., P. J. Miller, E. H. Wall, Y. Zheng, B. Dong, M. C. Neville y T. B. McFadden. 2004. Bovine glucose transporter GLUT8: cloning, expression and developmental regulation in mammary gland. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1680: 103-113.
- Zhu, Q., G. Anderson, G. T. Mucha, E. J. Parks, J. Metkowski y C. N. Mariash. 2005. The Spot 14 protein is required for *de novo* lipid synthesis in lactating mammary gland. *Endocrinology*, 146: 3343-3350.



