

ASSOCIATION OF IGF-1 CONTENT WITH WHOLE, REDUCED-FAT, AND LOW-FAT MILK IN MÉXICO

ASOCIACIÓN DEL CONTENIDO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO 1 CON LECHE ENTERA, SEMI-DESCREMADA Y DESCREMADA EN MÉXICO

Arlette **Marín-Quiroga**¹, Ignacio **Villanueva-Fierro**^{1*}, M. Alberto **Rodríguez-Pérez**²,
I. Antonio **Lares-Asseff**², Isaías **Cháirez-Hernández**¹, J. Bernardo **Proal-Nájera**¹

¹Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango, Sigma 119 Fraccionamiento 20 de Noviembre II, 34220, Durango, Durango. (iferro62@yahoo.com). ²Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Boulevard del Maestro S/N esquina Elías Piña, Colonia Narciso Mendoza, 88710, Ciudad Reynosa, Tamaulipas.

ABSTRACT

The content of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in bovine milk in México is unknown, and high levels could increase the health risk for adult people who ingest milk. The aim of this study was to determine the level of IGF-1 and its relationship with fat content using liquid chromatography with ion trap as a mass detector in milk marketed in Durango, México. During 18 months we analyzed, three times, six lots chosen randomly of whole, reduced-fat, and low-fat milk of three brands. Each sample was pre-treated using cut-off membranes, digested with trypsin, and subjected to liquid chromatography-mass spectrometry. There was a significant difference in the mean concentration of IGF-1 between the brands and types of milk analyzed (Chi square=34.66; $p \leq 0.005$). The correlation analysis revealed a positive exponential association between IGF-1 concentration and the fat content of milk with determination coefficients of 0.950 for brand 1, 0.974 for brand 2, and 0.984 for recombinant bovine growth hormone-free. To the best of our knowledge, this is the first study documenting an association between IGF-1 levels and fat content in milk. The decision to consume a brand with or without fat depends on the milk taste and IGF-1 requirements.

Keywords: Cut-off filtration, fat, insulin-like growth factor 1, milk analysis, somatomedin.

RESUMEN

El contenido del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) en leche bovina se desconoce y los niveles altos podrían incrementar el riesgo para la salud de los adultos que ingieren leche. El objetivo de este estudio fue determinar el nivel de IGF-1 en leche comercializada en Durango, México, y su relación con el contenido de grasa, mediante cromatografía líquida, con una trampa de iones que actúa como detector de masas. Durante 18 meses se analizaron seis lotes elegidos al azar de leche entera, semi-descremada y descremada de tres marcas, en tres ocasiones. Cada muestra fue pre tratada con membranas que restringen el peso molecular, digerida con tripsina, y se sometió a cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. Hubo una diferencia significativa en la concentración media de IGF-1 entre las marcas y los tipos de leche analizados (Ji cuadrada = 34.66; $p \leq 0.005$). El análisis de correlación reveló una asociación exponencial positiva entre la concentración de IGF-1 y el contenido de grasa de la leche, con coeficientes de determinación de 0.950 para la marca 1, 0.974 para la marca 2 y 0.984 para la leche libre de hormona de crecimiento bovino recombinada. Por lo que sabemos, este es el primer estudio que documenta una asociación entre los niveles de IGF-1 y el contenido de grasa en la leche. La decisión de consumir una marca con o sin grasa depende del sabor de la leche y los requerimientos de IGF-1.

Palabras clave: Filtración de restricción de peso molecular, grasa, factor de crecimiento insulínico tipo 1, análisis de leche, somatomedina.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: August, 2014. Approved: February, 2015.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 49: 113-123. 2015.

INTRODUCTION

According to official estimates, the state of Durango in northern México is the third largest producer of cow's milk in the country (Lactodata, 2014). In México and other countries, including USA, some dairy producers use recombinant bovine growth hormone (rBGH) to boost cows' milk production (Machlin, 1973; Daxenberger *et al.*, 1998). However, in Australia, Canada, Japan, and the EU, the sale of rBGH to dairy farmers and its use are prohibited (Cummins, 1999).

The use of rBGH stimulates liver production of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (Purup *et al.*, 1993; Epstein, 1996). The IGF-1 is a peptide of 70 amino acids with a molecular weight of 7650 Da (Clemmons, 1997) and its structure is identical in bovines and humans (Honegger and Humbel, 1986), which accounts for the recognition and utilization of the hormone by the human body. The natural concentration of IGF-1 in milk is 1.27-8.10 ng mL⁻¹ (Collier *et al.*, 1991), but IGF-1 concentration in 5777 random milk samples ranges from 1.0 to 83 ng mL⁻¹ (Daxenberger *et al.*, 1998) and 420 ng IGF-1 mL⁻¹ in colostrum (Piot *et al.*, 2004) ranging from 32 to 2,000 ng mL⁻¹ in some cases (Guauthier *et al.*, 2006).

Cattle that receive rBGH supplements may suffer mastitis due to an increase of up to 30 % in milk production and udders get swollen, coupled with endocrine effects that cause excessive hormones in the body and the development of diseases such as infertility and problems in the hooves that reduce the cow's life expectancy due to exhaustion and weakness (Resnicoff *et al.*, 1995). The increment of IGF-1 levels in blood and milk (Daxenberger *et al.*, 1998) and the increased influx of immunoreactive cells from blood into milk, induce a large increase of milk somatic cell counts (Bruckmaier *et al.*, 2004); besides, IGF-1 enhanced mammary cancer progression in rats (Hadsell and Bonnette, 2000; Thordarson *et al.*, 2004).

A meta-analysis confirmed a moderately elevated risk of Parkinson disease among people with high dairy consumption (Chen *et al.*, 2007). High quantities of IGF-1 are associated with the appearance of breast, colon, and prostate cancers, due to activity on the pituitary to induce powerful endocrine and metabolic

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con estimaciones oficiales, el estado de Durango en el norte de México es el tercer productor más grande de leche de vaca en el país (Lactodata, 2014). En México y otros países, incluyendo EE.UU., algunos productores de leche utilizan hormona de crecimiento bovino recombinada (rBGH) para estimular la producción de leche de vaca (Machlin, 1973, Daxenberger *et al.*, 1998). No obstante, en Australia, Canadá, Japón y la UE, la venta de rBGH a productores de leche y su uso están prohibidos (Cummins, 1999).

El uso de rBGH estimula la producción en el hígado del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Purup *et al.*, 1993; Epstein, 1996). El IGF-1 es un péptido de 70 aminoácidos con un peso molecular de 7650 Da (Clemmons, 1997) y su estructura es idéntica en bovinos y humanos (Honegger and Humbel, 1986), lo que explica el reconocimiento y el uso de la hormona por el cuerpo humano. La concentración natural de IGF-1 en leche es de 1.27 a 8.10 ng mL⁻¹ (Collier *et al.*, 1991), pero la concentración de IGF-1 en 5777 muestras aleatorias de leche es 1.0 a 83 ng mL⁻¹ (Daxenberger *et al.*, 1998) y en el calostro es 420 ng IGF-1 mL⁻¹ (Piot *et al.*, 2004), oscilando de 32 a 2,000 ng mL⁻¹ en algunos casos (Guauthier *et al.*, 2006).

El ganado que recibe suplementos de rBGH puede sufrir de mastitis debido al aumento de hasta 30 % en la producción de leche y se hinchan las ubres, junto con efectos endócrinos que causan un exceso de hormonas en el cuerpo y el desarrollo de enfermedades como infertilidad y problemas en las pezuñas que reducen la expectativa de vida de la vaca por agotamiento y debilidad (Resnicoff *et al.*, 1995). El aumento de niveles de IGF-1 en sangre y leche (Daxenberger *et al.*, 1998) y el mayor influjo de células inmunoreactivas de la sangre a la leche inducen un gran incremento en el recuento de células somáticas de la leche (Bruckmaier *et al.*, 2004); y el IGF-1 aumentó la progresión de cáncer de mama en ratas (Hadsell and Bonnette, 2000; Thordarson *et al.*, 2004).

Un meta análisis confirmó un riesgo moderadamente elevado de enfermedad de Parkinson entre personas con un alto consumo de lácteos (Chen *et al.*, 2007). Altas cantidades de IGF-1 están asociadas con la incidencia de cáncer de mama, colon y próstata, debido a la actividad sobre la pituitaria al inducir

effects, including cell growth and replication (Ashdown, 1996). Consumption of milk increases IGF-1 concentration in serum levels of infants and it might explain the positive effect in growth (Hoppe *et al.*, 2004); the higher levels of IGF-1 in milk could also favor obesity (Ejlerskov *et al.*, 2014). Rzehak *et al.* (2013) analyzed 1090 neonates fed milk formula with two protein concentrations (Low = 1.25 and 1.6 g 100 mL milk; High = 2.05 and 3.2 g 100 mL⁻¹ milk) and a control group (588 breastfed children); they found three single nucleotide polymorphisms (SNPs; rs1520220, rs978458 and 2 195 239), that the IGF-1 gene influenced positively the circulating levels IGF-1 and the molar concentration of IGF-1 / IGFBP-3 serum, which show that a higher intake of protein metabolic programming contributes to growth. The IGF-1 helps to regenerate damaged muscle mass (Mourkioti *et al.*, 2005), inhibits apoptosis (Dunn *et al.*, 1997), and enhances stem cell recruitment to injured skeletal muscle (Schulze and Spate, 2005). Aging appears to be associated with lower amounts of the growth hormone (GH) and IGF-1, and low calorie intake (Anderson *et al.*, 2009; Bartke, 2011). Milk consumption is associated with high levels of plasma IGF-1 (Morimoto *et al.*, 2005; Rich-Edwards *et al.*, 2007) and fetal weight increment with maternal milk (Hepppe *et al.*, 2011); besides, the levels of IGF-1 and insulin are diminished if milk is substituted with cola beverages (Hoppe *et al.*, 2009), confirming that milk intake increases IGF-1 levels.

Gauthier *et al.* (2006) used radioimmunoassay (RIA) and report that the IGF-1 content ranged from 0.6 to 150 ng mL⁻¹ for milk and 32 to 2000 ng mL⁻¹ for colostrum. The RIA test is not allowed in our research facilities, because a government permit is needed to handle radioactive substances (DOF, 2012). IGF-1 is also analyzed through an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) of serum (Ibrahim *et al.*, 2013). For milk, Castiglione *et al.* (2011), and Ollikainen and Muuronen (2013) used ELISA, due to its simplicity and reliability provided by a sample pre-treatment. Analysis of IGF-1 can also be performed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) (Sparbier *et al.*, 2005), and by MALDI-TOF with confirmation of metabolites by Western blotting (King *et al.*, 2009). Hence, we developed an analytical approach using liquid chromatography and mass spectrometry (LC-

efectos endócrinos y metabólicos fuertes, incluyendo crecimiento y replicación celular (Ashdown, 1996). El consumo de leche aumenta la concentración de IGF-1 en los niveles del suero de infantes y puede explicar el efecto positivo en el crecimiento (Hoppe *et al.*, 2004); los niveles mayores de IGF-1 en la leche también pueden producir obesidad (Ejlerskov *et al.*, 2014). Rzehak *et al.* (2013) analizaron 1090 neonatos que fueron alimentados con fórmula con dos concentraciones de proteína (Baja=1.25 y 1.6 g 100 mL⁻¹ leche; Alta = 2.05 y 3.2 g 100 mL⁻¹ leche) y un grupo testigo (588 niños alimentados con leche materna); encontraron tres polimorfismos de nucleótido simple (SNPs; rs1520220, rs978458 y 2 195 239), que el gen IGF-1 influyó positivamente los niveles de circulación de IGF-1 y una concentración molar de IGF-1 / IGFBP-3 suero, lo cual muestra que un consumo mayor de programación metabólica de las proteínas contribuye al crecimiento. El IGF-1 ayuda a regenerar masa muscular dañada (Mourkioti *et al.*, 2005), inhibe la apoptosis (Dunn *et al.*, 1997), y estimula el reclutamiento de células madre en músculo esquelético dañado (Schulze y Spate, 2005). El envejecimiento parece estar asociado con menores cantidades de la hormona de crecimiento (GH) e IGF-1, e ingesta menor de calorías (Anderson *et al.*, 2009; Bartke, 2011). El consumo de leche está asociado con niveles altos de IGF-1 en plasma (Morimoto *et al.*, 2005; Rich-Edwards *et al.*, 2007), y con un aumento del peso fetal con leche materna (Hepppe *et al.*, 2011); además, los niveles de IGF-1 e insulina disminuyen si la leche se sustituye con bebidas de cola (Hoppe *et al.*, 2009), lo cual confirma que el consumo de leche aumenta los niveles de IGF-1.

Gauthier *et al.* (2006) usaron radioinmunoensayo (RIA) y reportan que el contenido de IGF-1 fue de 0.6 a 150 ng mL⁻¹ para leche y 32 a 2000 ng mL⁻¹ para calostro. La prueba de RIA no es permitida en nuestras instalaciones de investigación, porque se requiere un permiso del gobierno para manejar sustancias radioactivas (DOF, 2012). El IGF-1 también se analiza con inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) del suero (Ibrahim *et al.*, 2013). Para leche, Castiglione *et al.* (2011) y Ollikainen y Muuronen (2013) usaron ELISA por su simplicidad y confiabilidad proporcionada por un pretratamiento de la muestra. El análisis de IGF-1 también se puede realizar por espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF)

MS), with a cut-off pre-treatment of the sample, to quantify IGF-1 levels in milk commercially available in Durango, northern México. The pre-treatment method was based on that used by Bobe *et al.* (1998) and Ollikainen and Muuronen (2013) with LC-MS, to determine the concentration of IGF-1 in whole, reduced-fat, and low-fat milk of three brands sold in Durango. Milk fat was analyzed using the 969.16 method (AOAC, 1997). So far, a safe level of IGF-1 in milk has not been established; in childhood it is associated with healthy growth and helps muscle regeneration, but it is not known whether it is healthy for adults to consume due to potential health risks associated with milk ingestion.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Acetonitrile, formic acid, trypsin type I (10 000 units mg protein⁻¹) from bovine pancreas, IGF-1, guanidine hydrochloride (GdnHCl), bis-tris, dithiothreitol (DTT), sodium citrate, hydrochloric acid (HCl) and Amicon™ ultra centrifugal filter units, were purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA).

Milk sampling

Three brands of cow's milk marketed in Durango were used to carry out the study from September 2011 to February 2013. All the samples were packed in Tetra Pak™ and taken randomly from the main grocery stores. Two out of the three brands cover more than 80 % of the milk consumed in Durango (Brands 1 and 2); the third brand was chosen as a control, labeled as rBGH-free, because the producers feed their cows with their own products free of pesticides and herbicides and they do not inject cows with hormones. In México, it is not forbidden to inject cattle with rBGH. For each brand, whole, reduced-fat, and low-fat milk were tested. The samples were replicated six times (3×3×6=54 samples), as recommended by the power test (Montgomery, 2002), taking the average of three analysis from each sample.

Chemical analysis

Besides the analysis of milk fat (method 969.16), the milk parameters required by the Mexican Norm (NOM, 2003) were analyzed: water (method 948.1), proteins (method 991.23) and lactose (930.28), which were determined according to AOAC,

(Sparbier *et al.*, 2005), y por MALDI-TOF con confirmación de metabolitos por electrotransferencia (Western blot) (King *et al.*, 2009). Así desarrollamos un enfoque analítico con cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS) y un pretratamiento de filtros de restricción de peso molecular de la muestra, para cuantificar los niveles de IGF-1 en leche disponible comercialmente en Durango, en el norte de México. El método de pretratamiento se basó en uno usado por Bobe *et al.* (1998) y Ollikainen y Muuronen (2013) con LC-MS, para determinar la concentración de IGF-1 en leche entera, semi-descremada y descremada de tres marcas vendidas en Durango. La grasa de la leche se analizó con el método 969.16 (AOAC, 1997). Hasta ahora no se ha establecido un nivel seguro de IGF-1 en la leche; en la niñez está asociado con un crecimiento saludable y ayuda a la regeneración muscular, pero se desconoce si afecta a los adultos que lo consumen debido a riesgos potenciales de salud asociados con la ingesta de leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

En Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) se compró acetonitrilo, ácido fórmico, tripsina tipo I (10 000 unidades mg proteína⁻¹) de páncreas de bovino, IGF-1, hidrocloreuro de guanidina (GdnHCl), bis-tris, ditiotretol (DTT), citrato de sodio, ácido hidrocloreuro (HCl) y unidades de filtración para ultra centrifuga marca Amicon™.

Muestreo de leche

Tres marcas de leche de vaca comercializada en Durango se usaron para realizar el estudio de septiembre 2011 a febrero 2013. Todas las muestras estaban empacadas en Tetra Pak™ y se eligieron al azar de tiendas de abarrotes principales. Dos de las tres marcas cubren más de 80 % de la leche consumida en Durango (Marcas 1 y 2); la tercera marca se eligió como testigo, etiquetada como libre de rBGH, porque los productores alimentan sus vacas con sus propios productos libres de pesticidas y herbicidas y no las inyectan con hormonas. En México, no está prohibido inyectar al ganado. Para cada marca se analizó leche entera, semi-descremada y descremada. Las muestras se replicaron seis veces (3×3×6=54 muestras), como lo recomienda la prueba de poder (Montgomery, 2002), tomando el promedio de tres análisis de cada muestra.

(1997), in order to determine whether the national specifications of milk are fulfilled (Table 1).

Pre-treatment of the samples

Two mL of milk were dissolved in 2 mL of a pH 6.8 buffer composed of 6 M GndHCl, 0.1 M bis-tris, 19.5 mM DTT, and 5.37 mM sodium citrate (Bobe *et al.*, 1998). The buffer was used to allowing protein denaturation, breaking the sulfur-sulfur bonds and decoupling them from the binding receptors. The mixture was transferred to a 10 kDa Amicon™ cut-off filter, centrifuged at $4000 \times g$ for 30 min, and rinsed with 2 mL of buffer. The retentate, containing α_{s1} -casein, α_{s2} -casein, β -casein, κ -casein, α -lactoglobulin and β -lactoglobulin, because of their molecular weights higher than 10 000, was discarded. The flow-through or eluate was then transferred to a 3-kDa Amicon™ cut-off filter, centrifuged at $20\ 000 \times g$ for 20 min, and rinsed with 2 mL of the buffer to eliminate lactose, salts, and low molecular weight components. The Amicon™ filter was inverted to retrieve the retained solution, which was reconstituted with 200 μ L of 1 mg mL⁻¹ trypsin solution in 1 mM HCl, and digested for 18 h at 37 °C. The digested sample was filtered at $20\ 000 \times g$ through a 3000 Mw Amicon™ cut-off filter, rinsed with a solution of acetonitrile:water:formic acid (100:900:1) to a pH of 4.3, and brought to a final volume of 200 μ L (10 times pre-concentrated). The retentate was discarded.

LC-MS analysis

A Varian 500-MS LC™ ion trap mass spectrometer with electrospray ionization (ESI), (Agilent Technologies, México), was used to perform the analysis of IGF-1. Firstly, the conditions were optimized to generate fragments from intact IGF-1, including needle voltage, spray shield, nebulizer gas (nitrogen), drying gas pressure rate (air), and drying gas temperature. Once the parameters were optimized, 20 μ L of each individually digested sample were injected using a Rehdoyne™ 6 port

Table 1. Expected quality of milk according to the Mexican Norm NOM-155-SCFI-2003.

Cuadro 1. Calidad esperada de la leche de acuerdo con la Norma Mexicana NOM-155-SCFI-2003.

Milk components	Contents (g L ⁻¹ of milk)		
	Whole	Reduced-fat	Low-fat
Fat	> 30	6 - 28	< 5
Lactose	43 - 50	43 - 50	43 - 50
Protein	> 30	> 30	> 30

Análisis químico

Además del análisis de la grasa de leche (método 969.16), se analizaron los parámetros requeridos por la Norma Mexicana (NOM, 2003): agua (método 948.1), proteínas (método 991.23) y lactosa (930.28), los cuales fueron determinados con AOAC (1997), para establecer si las especificaciones nacionales de leche se cumplen (Cuadro 1).

Pretratamiento de las muestras

Dos mL de leche se disolvieron en 2 mL de un amortiguador pH 6.8 compuesto por 6 M GndHCl, 0.1 M bis-tris, 19.5 mM DTT y 5.37 mM citrato de sodio (Bobe *et al.*, 1998). El amortiguador se usó para permitir la desnaturalización de la proteína, al romper los enlaces azufre-azufre, y los separa de los receptores vinculantes. La mezcla se transfirió a un filtro de corte de 10 kDa Amicon™, se centrifugó a $4,000 \times g$ por 30 min, y se enjuagó con 2 mL de amortiguador. El retentado, que contenía α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína, κ -caseína, α -lactoglobulina y β -lactoglobulina, se desechó, debido a sus pesos moleculares mayores de 10 000. El material eluido se transfirió a un filtro de corte de 3-kDa Amicon™, se centrifugó a $20\ 000 \times g$ por 20 min, y se lavó con 2 mL del amortiguador para eliminar lactosa, sales y componentes de bajo peso molecular. El filtro Amicon™ se invirtió para recuperar la solución retenida, la cual se reconstituyó con 200 μ L de 1 mg mL⁻¹ solución de tripsina en 1 mM HCl, y se digirió 18 h a 37 °C. La muestra digerida se filtró a $20\ 000 \times g$ a través de un filtro de corte de 3,000 Mw Amicon™, se enjuagó con una solución de acetonitrilo:agua:ácido fórmico (100:900:1) hasta un pH de 4.3, y se llevó a un volumen final de 200 μ L (10 veces pre-concentrado). El retentado se desechó.

Análisis LC-MS

Para realizar el análisis de IGF-1, se usó un espectrofotómetro de masa con trampa de iones e ionización de electrospray (ESI) Varian 500-MS LC™ (Agilent Technologies, México). Primero, las condiciones se optimizaron para generar fragmentos desde IGF-1 intacto, incluyendo voltaje de aguja, protector de rocío, nebulizador de gas (nitrógeno), tasa de presión de gas secante (aire), y temperatura de gas secante. Una vez optimizados los parámetros, se inyectaron 20 μ L de cada muestra individualmente digerida, usando una válvula manual de inyección de puerto Rehdoyne™ (Agilent Technologies, México). La tasa de flujo fue 0.05 mL min⁻¹ con una fase móvil de 70 % de solvent A y 30 % de solvente; el solvente A fue una mezcla 100:900:1 de acetonitrilo:agua:ácido fórmico y el solvente B fue una mezcla 900:100:1 de acetonitrilo:agua:ácido fórmico. La separación se

injection manual valve (Agilent Technologies, México). A flow rate of 0.05 mL min⁻¹ with a mobile phase of 70 % of solvent A and 30 % of solvent B, were used; solvent A was a 100:900:1 mixture of acetonitrile:water:formic acid and solvent B was a 900:100:1 mixture of acetonitrile:water:formic acid. The separation was performed using a Poroshell 300SB-C18 column (2.1×75 mm; 5 μm particle size) (Agilent Technologies, México).

Statistical analysis

A total of 54 samples were analyzed during 18 months and for the statistical analysis the Kruskal-Wallis test with the *Statistica* software version 7.0 was used because the data were not normalized. A calibration curve was constructed plotting each standard of known concentration versus the area of each standard. Linear regression was considered if the Pearson correlation coefficient (r) was > 0.99. The fat content of each type of milk for the three brands was plotted vs. IGF-1 content, and the curve that had the best fit according to the r^2 coefficients of determination was found.

RESULTS AND DISCUSSION

The sequences of the peptide fragments of IGF-1 and those resulting from digesting IGF-1 with trypsin were retrieved and blasted from the webpage of the Universal Protein Resource³ (Table 2), and they were organized by position of the fragment. Only fragment 5 had a molecular weight above 3000 Da, and it was retained in the 3000 Da cut-off filter.

The ESI chamber and standard optimized parameters were: needle voltage of 5000 V; spray shield of 600 V; nebulizer gas (nitrogen) pressure rate of 241 kPa; drying gas pressure rate (air) of 69 kPa; and drying gas temperature of 350 °C. The peptide fragments at positions 6 (GFYFNKPTGYGSSSR), 8 (APQTGIVDECCFR), and 19 (GSAGNK) gave the highest signals during optimization of the LC-MS system for undigested IGF-1. Optimization parameters such as capillary voltage, radiofrequency, and excitation voltage for the highest signals of the most abundant peptides found by LC-MS are summarized in Table 3. The optimal capillary voltage ranged from 150 to 250 V, the frequency from 118 to 183 Hz, and the excitation voltage from 0.94 to 2.55 V.

realizó usando una columna Poroshell 300SB-C18 (2.1×75 mm; 5 μm tamaño de partícula) (Agilent Technologies, México).

Análisis estadístico

Un total de 54 muestras se analizaron durante 18 meses y para el análisis estadísticos se usó la prueba de Kruskal-Wallis con el programa *Statistica* versión 7.0 porque los datos no estaban normalizados. Una curva de calibración se construyó al graficar cada estándar de concentración conocida contra el área de cada estándar. La regresión lineal se realizó cuando el coeficiente de correlación Pearson (r) era > 0.99. El contenido de grasa de cada tipo de leche de las tres marcas se graficó contra el contenido de IGF-1, y se encontró la curva con el mejor ajuste con base en los coeficientes de determinación r^2 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las secuencias de los fragmentos de péptidos de IGF-1 y los que resultan de la digestión de IGF-1 con tripsina se recuperaron y se descargaron de la página Web de Universal Protein Resource³ (Cuadro 2), y fueron organizados por posición del fragmento. Sólo el fragmento 5 tuvo un peso molecular mayor a 3000 Da, y se retuvo en el filtro de corte 3000 Da.

La cámara ESI y los parámetros estándar optimizados fueron: voltaje de aguja de 5,000 V; protección de espray de 600 V; tasa de presión del gas nebulizador (nitrógeno) de 241 kPa; tasa de presión del gas secante (aire) de 69 kPa; y temperatura del gas secante de 350 °C. Los fragmentos de péptidos en las posiciones 6 (GFYFNKPTGYGSSSR), 8 (APQTGIVDECCFR), y 19 (GSAGNK) dieron las señales más altas durante la optimización del sistema LC-MS para IGF-1 sin digerir. Los parámetros de optimización como el voltaje capilar, la radiofrecuencia y el voltaje de excitación para las señales más altas de los péptidos más abundantes encontrados con LC-MS, se resumen en el Cuadro 3. El voltaje capilar óptimo tuvo un rango de 150 a 250 V, la frecuencia de 118 a 183 Hz, y el voltaje de excitación de 0.94 a 2.55 V.

Dado que el fragmento 6 fue el más abundante, los análisis se basaron en el fragmento con peso molecular de 1667.8 Da. La linealidad fue de 0.1 a 50 ng mL⁻¹ (concentraciones bajas), y 100 a 1000 ng mL⁻¹ (concentraciones altas) del estándar de IGF-1; la regresión lineal con concentraciones bajas y altas

³ www.uniprot.org

Table 2. Amino acid sequence of peptides after trypsin digestion of bovine insulin-like growth factor-1 (IGF-1).**Cuadro 2. Secuencia de aminoácidos de los péptidos después de la digestión con tripsina del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1).**

Position	Weight (Da)	Peptide
1	334.4	MGK
2	1133.3	ISSLPTQLFK
3	978.2	CCFCDFLK
4	373.4	QVK
5	4821.5	MPITSSSHLFYALCLLAFTSSAT AGPETLCGAELVDALQFVCGDR
6	1667.8	GFYFNKPTGYGSSSR
7	174.2	R
8	1438.6	APQTGIVDECCFR
9	592.7	SCDLR
10	174.2	R
11	1363.7	LEMYCAPLKPAK
12	332.4	SAR
13	360.4	SVR
14	373.4	AQR
15	727.8	HTDMPK
16	345.4	AQK
17	624.7	EVHLK
18	476.5	NTSR
19	532.6	GSAGNK
20	451.5	NYR

Since fragment 6 was the most abundant, analyses were based on the fragment of molecular weight of 1667.8 Da. Linearity was between 0.1 and 50 ng mL⁻¹ (low concentrations), and between 100 and 1000 ng mL⁻¹ (high concentrations) of the IGF-1 standard; a linear regression with low and high concentrations

Table 3. Working parameters optimized for the analysis of insulin-like growth factor-1 fragments in liquid chromatography mass spectroscopy.**Cuadro 3. Parámetros de trabajo optimizados para el análisis de fragmentos del factor de crecimiento insulínico tipo 1 en cromatografía líquida con espectrometría de masas.**

Position	Mass	Capillary voltage	Radio-frequency	Excitation voltage
	(Mw)	(V)	(Hz)	(V)
6	1667.8	150	147	2.19
8	1438.6	250	118	0.94
19	532.5	250	183	2.55

mostró que ambos coeficientes de correlación de Pearson fueron > 0.99. La recuperación de IGF-1 de muestras contaminadas de leche con concentraciones altas y bajas de IGF-1 fue de 82 a 86 %. Con base en la tasa de señal de ruido de 3:1, el límite de detección del fragmento 6 fue 0.2 ng mL⁻¹ de leche (Cuadro 4). Las concentraciones de IGF-1 para leche libre de rBGH y semi-descremada se dejaron con fines visuales, aunque ambas fueron menores al límite de cuantificación. La leche entera tuvo el contenido más alto de IGF-1, con 79.7±23.1, 38.8±10.4 y 5.9±2.0 ng mL⁻¹ de leche para la Marca 1, la Marca 2 y la libre de rBGH, respectivamente. Estas concentraciones están dentro del intervalo reportado por Daxenberger *et al.* (1998), de 1 a 83 ng mL⁻¹ de leche, a partir del análisis RIA de 5777 muestras de leche natural, y dentro del rango de 0.6 a 150 ng mL⁻¹ de leche descrito por Guauthier *et al.* (2006). Pero son menores a los valores reportados por Ollikainen y Muuronen (2013), quienes usaron análisis pre-tratamiento y ELISA.

Las concentraciones de IGF-1 en leche son similares a las reportadas por Daxenberger *et al.* (1998) y Guauthier *et al.* (2006), lo cual confirma que usar el amortiguador de pretratamiento reportado por Bobe *et al.* (1998) seguido de la filtración de corte, genera datos confiables. El análisis con LC-MS usando el fragmento de 1667.8 Mw tiene un tiempo de análisis más corto que el método ELISA, pero LC-MS es menos preciso que ELISA (De Dios *et al.*, 2013). El IGF-1 en la leche entera de la marca libre de rBGH tuvo una baja concentración (5.9±2.1 ng mL⁻¹) y dentro del rango reportado por Colliers *et al.* (1991) de 1.27 a 8.10 ng mL⁻¹, confirmando que la leche etiquetada como libre de rBGH tuvo cantidades menores de IGF-1. Las altas desviaciones estándares de las muestras sugieren un bajo control de calidad por los productores. La leche entera de cada marca tuvo la concentración de IGF-1 más alta, seguida de la leche semi descremada y la descremada.

Los contenidos de proteína fueron 32.7±0.6, 34.4±0.5, y 33.8±0.5 g L⁻¹ de leche para la leche entera, semi-descremada y descremada, respectivamente; todas cumplen con el límite (>30 g L⁻¹ de leche) establecido por la Norma Mexicana. Los contenidos de grasa fueron 36.8±1.2, 18.3±1.5, y 5.5±1.0 g L⁻¹ de leche, para leche entera, semi descremada y descremada, respectivamente. El contenido de grasa de la leche descremada estuvo ligeramente arriba de

indicated that both Pearson correlation coefficients were >0.99 . The IGF-1 recovery of spiked milk samples of low and high IGF-1 concentrations was between 82 and 86 %. Based on a signal to noise ratio of 3:1, the detection limit of fragment 6 was 0.2 ng mL^{-1} of milk (Table 4). The concentrations of IGF-1 for rBGH-free and low-fat milk were left for visual purposes, even though they were below the limit of quantification. Whole milk had the highest IGF-1 content, with 79.7 ± 23.1 , 38.8 ± 10.4 and $5.9 \pm 2.0 \text{ ng mL}^{-1}$ of milk for Brand 1, Brand 2, and rBGH-free, respectively. These concentrations are within the range reported by Daxenberger *et al.* (1998), of 1 to 83 ng mL^{-1} of milk, from the RIA analysis of 5777 samples of natural milk, and within the range of 0.6 to 150 ng mL^{-1} of milk described by Guauthier *et al.* (2006). However, they are lower than the values reported by Ollikainen and Muuronen (2013), who used pre-treatment and ELISA analysis.

The IGF-1 concentrations in milk are similar to those reported by Daxenberger *et al.* (1998) and Guauthier *et al.* (2006), which confirms that using the pre-treatment buffer reported by Bobe *et al.* (1998) followed by cut-off filtration generates reliable data. Analysis with LC-MS using the fragment of 1667.8 Mw has a shorter analysis time than the ELISA method, but LC-MS is less accurate than ELISA (De Dios *et al.*, 2013). The IGF-1 in the whole-milk rBGH-free brand had a low concentration ($5.9 \pm 2.1 \text{ ng mL}^{-1}$) and within the range reported by Colliers *et al.* (1991) of 1.27 to 8.10 ng mL^{-1} , confirming that milk labeled as rBGH-free had lower amounts of IGF-1. The high standard deviations of the samples suggest poor quality control by milk producers. Whole milk for each brand had the highest concentration of IGF-1, followed by reduced-fat and low-fat milk.

Protein contents were 32.7 ± 0.6 , 34.4 ± 0.5 , and $33.8 \pm 0.5 \text{ g L}^{-1}$ of milk for whole, reduced-fat, and low-fat milk, respectively; they all fulfill the limit ($>30 \text{ g L}^{-1}$ of milk) established by the Mexican Norm. The fat contents were 36.8 ± 1.2 , 18.3 ± 1.5 , and $5.5 \pm 1.0 \text{ g L}^{-1}$ of milk, for whole, reduced-fat, and low-fat milk, respectively. The fat content of low-fat milk was slightly above the limits set by the Mexican Norm ($<5 \text{ g L}^{-1}$ milk), but the fat contents of the other milk, were within the limits (Table 1 and Table 5). Lactose contents were 34.7 ± 1.5 , 32.7 ± 1.5 , and $31.3 \pm 0.9 \text{ g L}^{-1}$ of milk for whole, reduced-fat, and low-fat milk, respectively. None of them fulfill the

los límites establecidos por la Norma Mexicana ($<5 \text{ g L}^{-1}$ leche), pero los contenidos de grasa de las otras leches estuvieron dentro de los límites (Cuadro 1; Cuadro 5). Los contenidos de lactosa fueron de 34.7 ± 1.5 , 32.7 ± 1.5 , y $31.3 \pm 0.9 \text{ g L}^{-1}$ de leche para leche entera, semi-descremada y descremada, respectivamente. Ninguna cumplió con la Norma Mexicana para lactosa ($43\text{-}50 \text{ g L}^{-1}$ de leche), probablemente porque se añadió agua.

Dado que se observaron contenidos más altos de IGF-1 para la leche entera, seguida de la semi-descremada y la descremada, el contenido promedio de grasa para cada tipo de leche se graficó contra el promedio de contenido de IGF-1 para cada marca de leche (Figura 1). El análisis de correlación reveló una asociación positiva entre la concentración de IGF-1 y el contenido de grasa de la leche que aumentó exponencialmente con el aumento en contenido de grasa y dependió de la marca: los coeficientes de determinación (r^2) fueron 0.950, 0.974 y 0.984 para las Marcas 1, 2 y libre de rBGH, respectivamente. La asociación entre IGF-1 y contenidos de grasa en leche no ha sido reportada antes. Sin embargo, parece que Ollikainen y Muuronen (2013) encontraron esta relación, pero no se dieron cuenta de ello. Las muestras sencillas de cada marca se mandaron al Laboratorio Nacional para analizarse por MALDI-TOF. Estos resultados también mostraron que la concentración de IGF-1 se relacionó con el contenido de grasa (datos no mostrados), pero sus límites de detección son mayores que los nuestros.

Table 4. IGF-1 concentrations obtained from nine different lots of milk.

Cuadro 4. Concentraciones de IGF-1 obtenidas de nueve lotes distintos de leche.

Brand of milk	Type of milk	IGF-1 concentration ng mL^{-1} of milk [†]
1	Whole	79.7 ± 23.1
	Reduced-fat	7.7 ± 1.7
	Low-fat	4.2 ± 1.7
2	Whole	38.8 ± 10.4
	Reduced-fat	5.6 ± 1.4
	Low-fat	2.8 ± 1.8
rBGH-free	Whole	5.9 ± 2.0
	Reduced-fat	0.36 ± 0.15
	Low-fat	0.11 ± 0.04

[†]Mean \pm SD \diamond Media \pm SD.

Table 5. Characterization of the main compounds found in three types of milk.**Cuadro 5. Caracterización de los compuestos principales encontrados en tres tipos de leche.**

Type of milk	Contents (g L ⁻¹) [†]		
	Proteins	Fat	Lactose
Whole	32.7±0.6	36.8±1.2	34.7±1.5
Reduced-fat	34.4±0.5	18.3±1.5	32.7±1.5
Low-fat	33.8±0.5	5.5±1.0	31.3±0.9

[†] Mean ± SD ♦ Media ± SD.

Mexican Norm for lactose (43–50 g L⁻¹ of milk), probably because water was added.

Since higher contents of IGF-1 were observed for whole milk, followed by reduced-fat and low-fat milk, the average fat content for each kind of milk was plotted against the average IGF-1 content for each brand of milk (Figure 1). Correlation analysis revealed a positive association between IGF-1 concentration and milk fat content that increased exponentially with the increase of fat content and depended on the brand: the coefficients of determination (r^2) were 0.950, 0.974 and 0.984 for Brands 1, 2, and rBGH-free, respectively. The association between IGF-1 and fat contents in milk has not been reported before. However, it seems that Ollikainen and Muuronen (2013) found this correlation, but they were not aware of it. Single samples of each brand were sent to a National Laboratory to be analyzed by MALDI-TOF. These results also showed that IGF-1 concentration was related to fat content (data not shown), but their limits of detection are above ours.

According to the Kruskal-Wallis test, there were significant differences between the brands and types of milk analyzed (Chi squared=34.66; $p \leq 0.005$). There were also significant differences in IGF-1 levels between Brands 1 and 3 ($p \leq 0.005$) and between kinds 1 and 3 ($p \leq 0.005$). The differences between milk samples of Brands 1 and 2 were not significant, and they are similar to those reported by Daxenberger *et al.* (1998) and Gauthier *et al.* (2006). These observations plausibly suggest that rBGH is probably not administered to cattle in the study area. However, given that IGF-1 levels may be influenced by many factors and vary considerably, it would be reasonable to expand this study to include a larger sample of different brands and types of milk.

De acuerdo con la prueba Kruskal-Wallis, hubo diferencias significativas entre las marcas y los tipos de leche analizados (J_i cuadrada=34.66; $p \leq 0.005$). También hubo diferencias significativas en los niveles de IGF-1 entre las Marcas 1 y 3 ($p \leq 0.005$) y entre los tipos 1 y 3 ($p \leq 0.005$). Las diferencias entre las muestras de leche de las Marcas 1 y 2 no fueron significativas, y son similares a las reportadas por Daxenberger *et al.* (1998) y Gauthier *et al.* (2006). Estas observaciones posiblemente sugieren que la rBGH probablemente no se administra al ganado en el área del estudio. Sin embargo, dado que los niveles de IGF-1 pueden haber sido influidos por muchos factores y variar considerablemente, sería razonable expandir este estudio para incluir una muestra más grande de distintas marcas y tipos de leche.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se encontró una correlación exponencial de la grasa en relación con la concentración de IGF-1 y el tipo de leche. El consumo del tipo de leche depende del sabor o la cantidad de grasa en la leche deseada por el consumidor y, con este estudio, de su contenido de IGF-1. Si se continúan estos estudios, el consumidor podría elegir la leche de acuerdo con la edad y el índice de masa corporal para evitar la obesidad. Este estudio se expandirá

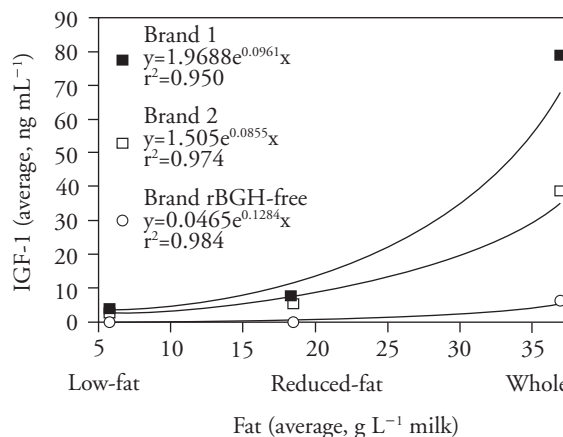


Figure 1. Correlation of the average fat vs. average IGF-1 content of three brands of milk and three types of milk.

Figura 1. Correlación del contenido de grasa promedio vs. IGF-1 promedio de tres marcas de leche y tres tipos de leche.

CONCLUSIONS

An exponential correlation of fat in relation to the IGF-1 concentration and type of milk was found. Consumption of the type of milk depends on the taste or amount of fat in milk desired by the consumer and, with this study, on its IGF-1 content. If these studies are continued, consumers could choose milk according to age and body mass index to avoid obesity. This study will be expanded to the other Mexican states to increase the number of samples and corroborate the association of fat and IGF-1, and the ELISA analysis will be implemented to compare the accuracy, sensibility and cost *versus* the LC-MS test.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M.G. Reyes for lab assistance in preparing and testing the samples. We appreciate the support of Secretaría de Investigación y Posgrado of the Instituto Politécnico Nacional for grants 20120967, 20110855, and FOMIX DGO-2008-C04-94500. All authors were supported by the Operation and Development Committee of Academic Activities (COFAA).

LITERATURE CITED

Anderson, R. M., D. Shanmuganayagam, and R. Weindruch. 2009. Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys. *Toxicol. Pathol.* 37: 47-51.

AOAC. 1997. Official Methods of Analysis. Association Official Analytical Chemist Inc. (16th ed. Vol. II, Chapter 33). Gaithersburg, Maryland, USA.

Ashdown, K. 1996. New Study Warns of Breast and Colon Cancer Risks from rBGH Milk, Press Release, Press Conference, National Press Club Washington D. C., p. 3.

Bartke, A. 2011. Single-gene mutations and healthy ageing in mammals. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 366: 28-34.

Bobe, G., D. C. Beitz, A. E. Freeman, and G. L. Lindberg. 1998. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 46: 458-463.

Bruckmaier, R. M., C. E. Ontsouka, and J. W. Blum. 2004. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *Vet. Med. -Czech.* 8: 283-290.

Castigliano, L., X. Li, Armani, Andrea, M. Mazzi, and A. Guidi. 2011. An immunoenzymatic assay to measure insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in buffalo milk with an IGF binding protein blocking pre-treatment of the sample. *Int. Dairy J.* 21: 421-426.

Chen, H., E. O'reilly, M. L. McCullough, C. Rodriguez, M. A. Schwarzschild, E. E. Calle, *et al.* 2007. Dairy products and risk of Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.* 165: 998-1006.

Clemmons, D. R. 1997. Insulin-like growth factor binding

proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth F. R.* 8: 45 -62.

Collier, R. J., M. A. Miller, J. R. Hildebrandt, A. R. Torkelson, T. C. White, K. S. Madsen, *et al.* 1991. Factors affecting insulin-like growth factor-1 concentration in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 74(9) 2905-2911.

Cummins, R. 1999. Hazards of Genetically Engineered Foods and Crops. In *Motion Magazine*. Little Marais, Minnesota, USA. pp: 1-4.

Daxenberger, A., B. H. Breier, and H. Sauerwein. 1998. Increased milk levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) for the identification of bovine somatotropin (bST) treated cows. *Analyst* 123: 2429-2435.

De Dios, K., A. Manibusan, R. Marsden, and J. Pinkstaff. 2013. Comparison of bioanalytical methods for the quantitation of PEGylated human insulin. *J. Immunol. Methods.* 396: 1-7.

DOF 2012. Official Journal of the Federation. Agreement establishing the classification and codification of goods whose import and export is subject to authorization by the Ministry of Energy. http://www.normateca.gob.mx/Archivos/54_D_3244_12-10-2012.pdf (Accesed: December 2014).

Dunn, S. E., R. A. Hardman, F. W. Kari, and J. C. Barrett. 1997. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) alters drug sensitivity of HBL100 human breast cancer cells by inhibition of apoptosis induced by diverse anticancer drugs. *Cancer Res.* 57: 2687-2693.

Ejlertskov K. T., A. Larnkjaer, D. Pedersen, C. Ritz, C. Mølgaard, and K.F. Michaelsen. 2014. IGF-I at 9 and 36 months of age — relations with body composition and diet at 3 years — the SKOT cohort. *Growth Horm. IGF Res.* 24: 239-244.

Epstein, S. S. 1996. Unlabeled milk from cows treated with biosynthetic growth hormones: a case of regulatory abdication. *Int. J. Health Serv.* 26: 173-185.

Gauthier, S. F., Y. Pouliot, and J. L. Maubois. 2006. Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities. *Lait* 86: 99-125.

Hadsell, D. L., and S. G. Bonnette. 2000. IGF and insulin action in the mammary gland: lessons from transgenic and knockout models. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5: 19-30.

Heppe, D. H., R. M. Van Dam, S. P. Willemsen, H. Den Breeijen, H. Raat, A. Hofman, E. A. P. Steegers, V. W. V. Jaddoe. 2011. Maternal milk consumption, fetal growth, and the risks of neonatal complications: the Generation R Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 94: 501-509.

—Fin de la versión en Español—

-----*-----

- Honegger, A., and R. E. Humbel. 1986. Insulin-like growth factors I and II in fetal and adult bovine serum. Purification, primary structures, and immunological cross-reactivities. *J. Biol. Chem.* 261: 569-575.
- Hoppe, C., C. Mølgaard, A. Juul, and K. F. Michalsen. 2004. High intakes of skimmed milk, but not meat, increase serum IGF-1 and IGFBP-3 in eight-year-old boys. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58: 1211-1216.
- Hoppe, C., M. Kristensen, M. Boiesen, J. Kudsk, K. Fleischer Michaelsen, and C. Mølgaard. 2009. Short-term effects of replacing milk with cola beverages on insulin-like growth factor-I and insulin-glucose metabolism: a 10 d interventional study in young men. *Br. J. Nutr.* 102: 1047-1051.
- Ibrahim, A. S., H. A. Attia, A. M. Rabea, and A. M. El-Gayar. 2013. Serum levels of glycosaminoglycans (GAGs) and insulin like growth factor-1 (IGF-1) as diagnostic markers for early hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with or without diabetes. *J. Med. Lab. Diagn.* 4: 8-20.
- King, C. C., K. Bouic, and T. Friedmann. 2009. A fractionation method to identify quantitative changes in protein expression mediated by IGF-1 on the proteome of murine C2C12 myoblasts. *Proteome Sci.* 7: 28.
- Lactodata. 2014. Information about the Dairy Industry, in Spanish, http://www.lactodata.com/lactodata/docs/ind/lacto_ind_prod.pdf (Accessed: March 2014).
- Machlin, L. J. 1973. Effect of growth hormone on milk production and feed utilization in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 56: 575-580.
- Montgomery, D. C. 2002. *Diseño y Análisis de Experimentos* (2^a. ed.). México, DF: Editorial Limusa, SA de CV. pp: 40-41.
- Morimoto, L. M., P. A. Newcomb, E. White, J. Bigler, and J. D. Potter. 2005. Variation in plasma insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3: personal and lifestyle factors (United States). *Cancer Causes Control* 16: 917-927.
- Mourikioti, F. and N. Rosenthal. 2005. IGF-1 inflammation and stem cells: interaction during muscle regeneration. *Trends Immunol.* 26 (10): 535-542.
- NOM 2003. Milk, milk formula and combined milk product-names, physical and chemical specifications, commercial information and test methods, <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2007/CDAgropecuaria/pdf/83NOM.pdf> (Accessed: March 2014).
- Ollikainen, P., and K. Muuronen. 2013. Determination of insulin-like growth factor-1 and bovine insulin in raw milk and its casein and whey fractions after microfiltration and ultrafiltration. *Int. Dairy J.* 28: 83-87.
- Piot, M., J. Fauquant, M.-N. L. Madec, and J.-L. Maubois. 2004. Preparation of serocolostrum by membrane microfiltration. *Le Lait* 84: 333-341.
- Purup, S., K. Sejrsen, J. Foldager, and R. M. Akers. 1993. Effect of exogenous bovine growth hormone and ovariectomy on prepubertal mammary growth, serum hormones and acute in-vitro proliferative response of mammary explants from Holstein heifers. *J. Endocrinol.* 139: 19-26.
- Resnicoff, M., D. Abraham, W. Yutanawiboonchai, H. L. Rotman, J. Kajstura, R. Rubin, P. Zoltick, R. Baserga. 1995. The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res.* 55: 2463-2469.
- Rich-Edwards, J. W., D. Ganmaa, M. N. Pollak, E. K. Nakamoto, K. Kleinman, U. Tserendolgor, W. C. Willett, A. L. Frazier. 2007. Milk consumption and the prepubertal somatotrophic axis. *Nutr. J.* 6: 28.
- Rzehak P., V. Grote, E. Lattka, M. Weber, D. Gruszfeld, P. Socha, R. Closa-Monasterolo, J. Escribano, M. Giovannini, E. Verduci, P. Goyens, F. Martin, J. P. Langhendries, H. Demmelmair, N. Klopp, T. Illig, B. Koletzko. 2013. Association of IGF-1 gene variants and milk protein intake with IGF-1 concentrations in infants at age 6 months – Results from randomized clinical trial. *Growth Horm. IGF Res.* 23: 149-158.
- Schulze, P. C., and U. Spate. 2005. Insulin-like growth factor-1 and muscle wasting in chronic heart failure. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 2023-2035.
- Sparbier, K., S. Koch, I. Kessler, T. Wenzel, and M. Kostrzewa. 2005. Selective isolation of glycoproteins and glycopeptides for MALDI-TOF MS detection supported by magnetic particles. *J. Biomol. Tech.* 16: 407-413.
- Thordarson, G., N. Slusher, H. Leong, D. Ochoa, L. Rajkumar, R. Guzman, *et al.* 2004. Insulin-like growth factor (IGF)-I obliterates the pregnancy-associated protection against mammary carcinogenesis in rats: evidence that IGF-I enhances cancer progression through estrogen receptor-alpha activation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Breast Cancer Res.* 6: R423-436.