

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR III E INMUNOLOGÍA**



**EVALUACIÓN NUTRICIONAL E INMUNOLÓGICA DE
HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS LÁCTEAS UTILIZADOS
EN EL DESARROLLO DE UNA NUEVA FÓRMULA INFANTIL
HIPOALERGÉNICA**

TESIS DOCTORAL

PENÉLOPE MARÍA SÁNCHEZ MONTALBÁN

GRANADA

2007

**EVALUACIÓN NUTRICIONAL E INMUNOLÓGICA DE
HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS LÁCTEAS UTILIZADOS
EN EL DESARROLLO DE UNA NUEVA FÓRMULA INFANTIL
HIPOALERGÉNICA**

Memoria que presenta la Lda. D^a. Penélope María Sánchez Montalbán para aspirar al grado de Doctora en Biología

Dr. D. Ricardo Rueda Cabrera
Director de la Tesis

Prof. Dr. D. Ángel Gil Hernández
Director de la Tesis

Dr. D. Ricardo Rueda Cabrera, Director Asociado del área Investigación Estratégica del Departamento de I+D de Abbott Laboratorios S.A.

CERTIFICA: Que los trabajos que se exponen en la memoria de tesis Doctoral *Evaluación Nutricional e Inmunológica de Hidrolizados de Proteínas Lácteas utilizados en el Desarrollo de una Nueva Fórmula Infantil Hipoalergénica* han sido realizados en el Departamento de I+D de Abbott Laboratorios S.A., correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos. La presente memoria ha sido revisada por nosotros, encontrándola conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor en Biología por el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones legalmente vigentes, a los efectos oportunos.

Prof. Dr. D. Ángel Gil Hernández, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que los trabajos que se exponen en la memoria de tesis Doctoral *Evaluación Nutricional e Inmunológica de Hidrolizados de Proteínas Lácteas utilizados en el Desarrollo de una Nueva Fórmula Infantil Hipoalergénica* han sido realizados en el Departamento de I+D de Abbott Laboratorios S.A., correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos. La presente memoria ha sido revisada por nosotros, encontrándola conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor en Biología por el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones legalmente vigentes, a los efectos oportunos.



Este trabajo ha sido financiado por una beca con cargo a proyectos cofinanciados con fondos FEDER del Ministerio de Ciencia y Tecnología y por ABBOTT LABORATORIOS S.A.

Parece mentira, pero al fin la he terminado. La verdad es que no me lo creo todavía.

A mí, que como todos los que me conocen soy bastante tímida, me resulta especialmente complicado este apartado. Y sé que es lo primero que todo el mundo va a leer. Por eso no me gusta. Todos mis compañeros y amigos buscarán entre estas líneas a ver dónde aparece su nombre y que digo de cada uno de ellos.

Pues bien, no voy a hacerlo. No voy a hacer la clásica lista en la que se incluye a todo el que de una manera o de otra ha colaborado o inspirado este trabajo. Sobre todo porque son muchas las personas que me han ayudado y apoyado, y si hago una lista puede que falte alguien, sólo por despiste, y se sienta defraudado. También porque espero haber agradecido a cada uno su colaboración o ayuda en el momento preciso. Y otra de las razones es que siempre me ha parecido un peloteo insufrible el enumerar las virtudes de tus directores de tesis, tus jefes, tus compañeros, tus amigos o tu familia en estas páginas. Si al fin y al cabo son todos maravillosos, para que repetirse a lo largo de varios folios. Espero que nadie se lo tome a mal.

Aunque en líneas generales si quiero decir o escribir, que sin los “empujoncitos” de mis directores de tesis y mis jefes en el trabajo, nunca habría llegado a este punto. También es de ley mencionar que por el camino, directa o indirectamente, mis compañeros de trabajo y mis amigos han ayudado y no poco a la realización de mi tesis: participando en la elaboración de las dietas, el cuidado de los animales, enseñándome las distintas técnicas, aclarándome un poco eso de la estadística o simplemente estando ahí y creando buen ambiente, haciendo la cosa más llevadera. En los tiempos del trabajo experimental resultó muy valiosa la colaboración del personal del CSIC de Armilla y del animalario de Cartuja. Pero hay que reconocer que los que más se han sacrificado para que el trabajo saliese adelante fueron sin duda mis ratitas y cobayas, gracias pequeños. Para llegar a cualquier final debe existir un punto de partida, a mi me dieron la salida personas dignas de total admiración, gracias familia (la vieja y la nueva) por seguir ayudándome a crecer.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Introducción.....	9
Antecedentes bibliográficos.....	15
1.- Nutrición e inmunidad.....	17
1.1.- Sistema inmunológico intestinal.....	17
1.2.- Influencia de nutrientes específicos sobre el sistema inmunológico.....	20
1.3.- Lactancia materna vs. Lactancia artificial y su influencia sobre el sistema inmunológico.....	28
2.- Alergia.....	32
2.1.- Tolerancia oral.....	34
2.2.- Alergia alimentaria.....	37
3.-Prevención y tratamiento de la alergia alimentaria.....	42
3.1.- Lactancia materna y prevención de atopia.....	43
3.2.- Utilización de fórmulas infantiles como alternativa a la lactancia materna.....	45
3.3.- Pautas de prevención de la alergia alimentaria.....	47
3.4.- Pautas de tratamiento de la alergia alimentaria.....	48
4.-Evaluación de las fórmulas infantiles para la prevención y tratamiento de la alergia a proteínas de leche de vaca.....	50

4.1.- Metabolismo de aminoácidos en el lactante.....	50
4.2.- Evaluación nutricional.....	66
4.3.- Evaluación de antigenicidad y alergenicidad.....	71
4.3.1.- Métodos <i>in vitro</i>	71
4.3.2.- Métodos <i>in vivo</i>	72
Material y métodos.....	75
Resultados.....	119
Discusión.....	145
Conclusiones.....	167
Bibliografía.....	171
Notas.....	193

Abreviaturas

ABREVIATURAS:

AAP: Academia Americana de Pediatría

AGPI n-3: Ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3

Ala: Alanina

Amx: Absorbancia máxima

ANOVA: Análisis de la varianza

Ans = Anserina

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

APCs: Células presentadoras de antígeno

Arg: Arginina

Asn: Asparragina

Asp: Ácido aspartico

ATP: Adenosin trinucleótido fosfato

BCA: Aminoácidos de cadena ramificada

C+: Control positivo

Carn: Carnosina

CDV: Coeficiente de digestibilidad verdadera

Cit: Citrulina

Cu: Cobre

CV= coeficiente de variación

Cys: Cisteina

Da: Dalton

DC: Células dendríticas

Ddp: Diferencia de potencial

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DO: Densidad óptica o absorbancia

E: aminoácidos esenciales

EAST : Enzyme-allergosorbent-test

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ESPACI: Sociedad Europea de Alergología Pediátrica e Inmunología Clínica

ESPGHAN: Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FDA: *Food and Drug Administration*

Fe: Hierro.

g/Kg/día: Gramos por kilogramo de peso y día

g/l: Gramos por litro

g: Gramo

GALT: Tejido linfoide asociado a intestino

Gln: Glutamina

Glu: Ácido glutámico

Gly: Glicina

GSH: Glutation

His: Histidina

H-Lys-2: Hidroxilisina-2

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión.

IAC: Caseína inmunológicamente activa

IAW: Proteína sérica inmunológicamente activa

IFN-?: Interferon ?

IgA: Inmunoglobulina A

IgE: Inmunoglobulina E

IGF-I: *Insulin-like growth factor-I*

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

Ile: Isoleucina

IL-n: Interleuquina n.

Isc: Intensidad de corriente

Kda: Kilodalton

L1: Peptigen IF-3002 L-10206301

L1-100 a L1-MIX: Distintas muestras del hidrolizado problema

Leu: Leucina

LHC: Hidrolizado control

Lys: Lisina

1M-His+Ans: 1-metil-histidina + anserina

Met: Metionina

MHC: Complejo mayor o principal de histocompatibilidad.

µg/l: microgramos por litro

mM: Milimolar

NE: Aminoácidos no esenciales

ng/ml: Nanogramos por mililitro

NK: Células agresoras naturales

nm: Nanomolar

NPU: Utilización neta de la proteína

N-terminal: Amino terminal.

Oh-Pro: Hidroxi- prolina

OMS: Organización Mundial de la Salud

Orn: Ornitina

p/v: Relación peso-volumen

PBS: Tampón fosfato.

Pea: Fosfoetanolamina

PER: Coeficiente de eficacia en crecimiento (*Protein Efficiency Ratio*)

PGE₂: Prostaglandina E₂

Phe: Fenilalanina

Pro: Prolina

p-Ser: Fosfoserina

RNA: Ácido ribonucleico.

rpm: Revoluciones por minuto

s: Desviación estándar

SEM: Error estandar

Ser: Serina

SIDA: Síndrome de Inmodeficiencia Adquirida

SigA: Inmunoglobulina A secretora.

STD: Patrón

TGF- β : Factor de crecimiento tumoral β

Thr: Treonina

TLR: receptores "toll-like"

TMB 3,3', 5,5': Tetrametilbencidina

TNF-a: Factor de necrosis tumoral a.

TPAN: Nucleósidos totales potencialmente disponibles (*Total potentially available nucleosides*)

Trp: Triptofano

Tyr: Tirosina

UAB: Tampón universal (*Universal assay buffer*)

UI: Unidades internacionales

v/v: Relación volumen-volumen

Val: Valina

VB: Valor biológico de la proteína

Zn: Zinc

Introducción

INTRODUCCIÓN

La incidencia de las enfermedades alérgicas ha aumentado durante los últimos años de forma alarmante en los países desarrollados (Stone, 2003). Las alergias alimentarias son frecuentemente las manifestaciones más tempranas, siendo la alergia a las proteínas de la leche de vaca la más común en niños menores de un año (2-6%) (Hill *et al.*, 1997; Exl y Fritsche, 2001; Garcia-Ara *et al.*, 2004). La alergia a la leche de vaca consiste en una reacción inmunológica frente a las proteínas de la leche caracterizada por la producción de anticuerpos IgE específicos y por la aparición de síntomas, fundamentalmente, en el tracto gastrointestinal (vómitos y diarrea) y la piel (dermatitis atópica, urticaria). Estos síntomas pueden reducirse significativamente mediante el mantenimiento de la lactancia materna hasta los 4-6 meses de vida, conjuntamente con un retraso en la introducción de otros alimentos. En muchos casos esto no es posible y se hace necesario sustituir o suplementar la leche materna con una fórmula infantil, cuyo valor nutricional debe ser lo más semejante posible al de la leche humana y además no debe inducir sensibilización a alérgenos alimentarios.

Se han desarrollado fórmulas infantiles de alergenidad reducida basadas en hidrolizados de proteínas lácteas destinadas a la nutrición de niños alérgicos a las proteínas de leche de vaca, o con riesgo de serlo. Las fórmulas hipoalérgicas deben ser nutricionalmente adecuadas y seguras para los individuos atópicos. Desde el punto de vista de composición se distinguen dos tipos fundamentales de hidrolizados de proteínas lácteas: de caseína y de proteína sérica. El grado de hidrólisis de los productos hipoalérgicos puede variar. Existen productos basados en hidrolizados de proteínas lácteas con alto grado de hidrólisis (50-55 %) que raramente se han asociado con reacciones adversas y cuyo principal inconveniente es el sabor amargo generado por péptidos de pequeño tamaño. Se han desarrollado productos con una base proteica menos hidrolizada (12-15 % de grado de hidrólisis), con los objetivos de inducir el desarrollo de tolerancia oral a los alérgenos de la leche de vaca y de mejorar las características organolépticas de este tipo de fórmulas, pero estos hidrolizados

parciales de proteínas lácteas no son considerados seguros para niños alérgicos a las proteínas de la leche de vaca o con alto riesgo de serlo.

Las fórmulas hipoalergénicas, además de nutricionalmente adecuadas, deben ser seguras para los individuos atópicos. Según el "Nutritional Committee of the American Academy of Paediatrics" para que una fórmula pueda considerarse hipoalergénica debe mostrar una tolerancia clínica del 90 % en niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca mediada por IgE, con un intervalo de confianza del 95 % (ESPGHAN, 1993; Host *et al.*, 1999). Este tipo de estudios, además de un alto coste y considerable duración en el tiempo, conllevan riesgos para los sujetos incluidos en ellos.

Todos estos factores hacen necesaria la caracterización nutricional e inmunológica de los potenciales ingredientes y de las fórmulas en desarrollo mediante métodos preclínicos eficaces. Así, el objetivo de este trabajo es la evaluación nutricional e inmunológica, usando métodos *in vitro* e *in vivo*, de hidrolizados de proteínas lácteas utilizados en el desarrollo de una nueva fórmula infantil hipoalergénica. Con esta nueva fórmula se pretenden mejorar tres aspectos fundamentales. En primer lugar, que la fuente proteica tenga un perfil de aminoácidos lo más semejante posible al de la leche humana. En segundo lugar, se pretenden mejorar las características organolépticas, disminuyendo el amargor característico de los péptidos presentes en los hidrolizados de proteínas lácteas. Finalmente, se pretende, en la medida de lo posible, disminuir el contenido antigénico presente en la fórmula.

La caracterización de los hidrolizados seleccionados como potenciales ingredientes se ha llevado a cabo en cuatro apartados:

- ✓ Evaluación *in vivo* de la calidad nutricional de hidrolizados de proteínas lácteas, mediante el estudio del balance de nitrógeno, el coeficiente de eficacia en crecimiento y el perfil de aminoácidos libres en plasma, hígado y músculo de ratas.

- ✓ Desarrollo y validación de un método *in vitro*, un enzimoimmunoensayo, para la cuantificación de proteína sérica inmunológicamente activa en hidrolizados lácteos y fórmulas infantiles de alergenicidad reducida.

- ✓ Cuantificación *in vitro* de caseína y proteína sérica inmunológicamente activas en hidrolizados lácteos y fórmulas infantiles de alergenicidad reducida.

- ✓ Evaluación *in vivo* de la alergenicidad de una fórmula infantil en cobayas.

Antecedentes Bibliográficos

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS:

1.- Nutrición e inmunidad

La ingesta de diferentes alimentos o ingredientes alimentarios se ha relacionado con efectos sobre el sistema inmunológico en diversos estudios (Gil y Rueda, 2002; Hanson *et al.*, 2003). Esta relación suscita especial interés en las primeras etapas de la vida, cuando el sistema inmunológico es aun relativamente inmaduro. En este periodo se han descrito diferencias en la maduración del sistema inmunológico de niños alimentados con fórmulas infantiles con respecto a los alimentados mediante lactancia materna (Hanson *et al.*, 2003).

El tejido linfoide asociado a intestino, GALT, procesa los antígenos con los que entra en contacto la mucosa intestinal (Rueda y Gil, 2000; Mowat, 2003; Smith y Nagler-Anderson, 2005). El GALT debe ser capaz de responder de forma efectiva frente a antígenos patógenos para proteger al organismo de infecciones, pero al mismo tiempo, debe también discriminar y no responder a antígenos inocuos, como los que aparecen en los alimentos o los propios de las bacterias de la microbiota intestinal. Este fenómeno se conoce como tolerancia oral y en la regulación de este equilibrio pueden influir diferentes nutrientes (Mowat, 2003; Garside *et al.*, 2004).

1.1.- Sistema inmunológico intestinal

La mucosa gastrointestinal es una barrera de estructura compleja que proporciona una superficie enorme para el procesamiento y absorción de los alimentos ingeridos (Mayer, 2003). Para evitar la penetración de los antígenos la mucosa emplea mecanismos físico-químicos y celulares. Entre las células epiteliales las uniones son muy estrechas; éstas se encuentran además recubiertas por una capa de mucus que atrapa partículas, bacterias etc. La presencia en el intestino de las sales biliares, así como los pHs extremos,

contribuyen a la destrucción de patógenos y a la transformación de algunos antígenos en sustancias no inmunogénicas.

Tanto el sistema innato (células NK, leucocitos polimorfonucleares, macrófagos, células epiteliales y receptores “toll-like”) como el adaptativo (linfocitos intraepiteliales y de lámina propia, placas de Peyer, IgA secretora y citocinas) proporcionan protección activa frente a antígenos extraños. Sin embargo, la falta de madurez de varios componentes de la barrera intestinal y del sistema inmunológico reduce la eficiencia de la barrera mucosal infantil (Weaver *et al.*, 1987). La actividad enzimática es inferior en el recién nacido y la producción de IgA secretora no alcanza la madurez hasta los 4 años de edad (Mayer, 2003). Esta inmadurez de la barrera mucosal es causa fundamental del incremento de las infecciones gastrointestinales y la alergia alimentaria que se han observado en los primeros años de vida (Sampson, 1999).

Independientemente de esto, incluso en el intestino normal maduro, alrededor del 2% de los antígenos ingeridos con los alimentos son absorbidos y transportados a través del organismo en su forma inmunológicamente activa (Husby, 1987). La inducción de hiporrespuesta inmunológica antígeno-específica o tolerancia oral es la respuesta normal frente a los antígenos alimentarios.

En la respuesta inmunológica intestinal normal las células M constituyen la vía principal por la que los antígenos complejos alcanzan el sistema inmunológico intestinal. Estas células son enterocitos especializados sin microvilli ni capa de mucus en su superficie apical, localizadas en el epitelio intestinal, entre los enterocitos. Se cree que transfieren el antígeno intacto a células presentadoras de antígeno (APCs) localizadas en el epitelio o en la región subyacente a la cúpula de las placas de Peyer, tras lo cual, estas APCs migran hacia el interior para interactuar con células T y B (Mowat, 2003, Garside *et al.*, 2004).

Las placas de Peyer consisten en agrupaciones de grandes folículos de células B y áreas de células T, presentes en la submucosa a lo largo del intestino delgado. Se han descrito

varios subtipos de células dendríticas (DC) en las placas de Peyer. Probablemente, estas son las APCs implicadas en la interacción del antígeno con los linfocitos B inmaduros y los linfocitos T, localizados en los centros germinales y las regiones interfoliculares. Los linfocitos así activados por el antígeno llegan a través del drenaje linfático a los nódulos linfáticos mesentéricos, donde permanecen un periodo indefinido de tiempo, y posteriormente, alcanzan el torrente sanguíneo a través del conducto torácico. Tras recircular durante varios días, se diferencian en células efectoras maduras que se acumulan en la lámina propia y el epitelio intestinal (Mowat, 2003, Brandtzaeg y Johansen, 2005).

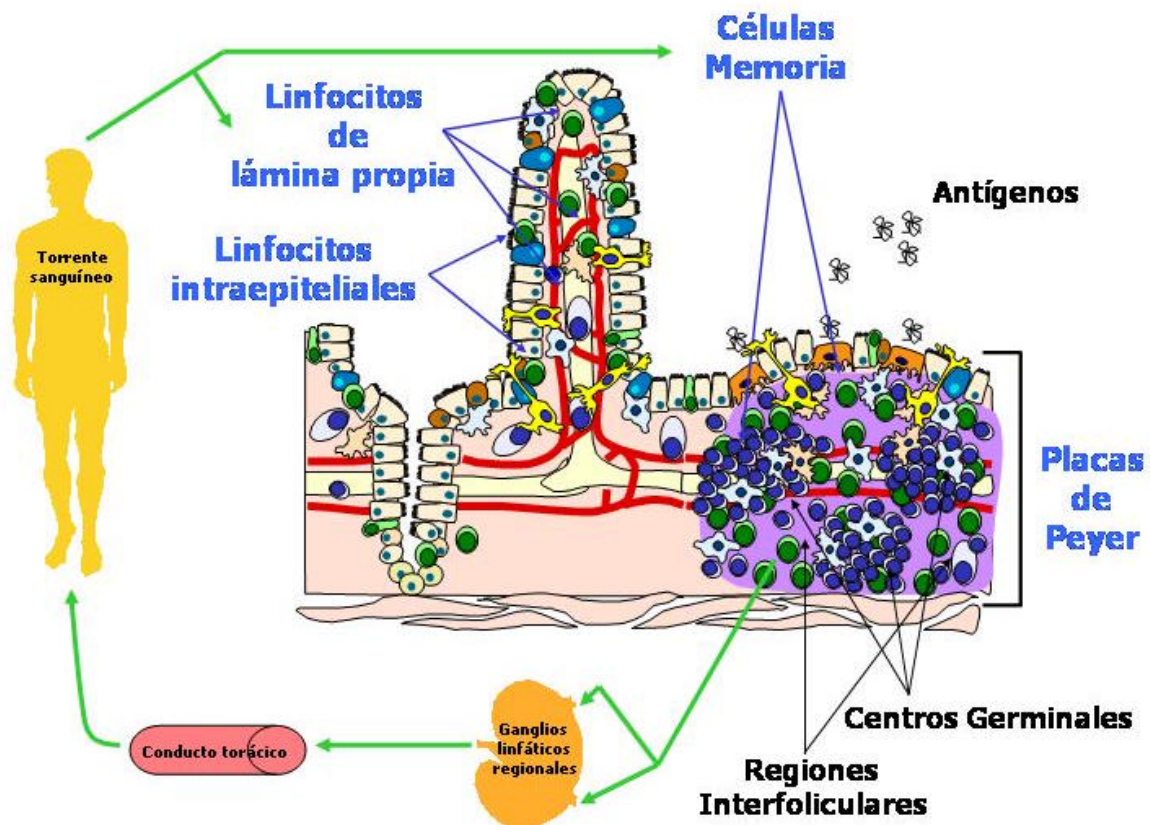


Figura 1: Esquema de la respuesta inmunológica intestinal (Adaptado de Rueda, 2005).

Recientemente, se ha demostrado otra vía de interacción entre antígenos presentes en el lumen intestinal y el sistema inmunológico. Células dendríticas presentes, bien en las placas de Peyer o bien en la lámina propia, son capaces de emitir pseudópodos hasta el

lumen intestinal e interactuar con antígenos allí presentes. Estos antígenos son procesados y presentados a células T colaboradoras subyacentes iniciando el proceso anteriormente descrito. Se cree que esta forma de contacto entre antígenos y células dendríticas juega un papel fundamental en los procesos de tolerancia oral y defensa frente a patógenos intestinales (Niess *et al.*, 2005).

1.2.- Influencia de nutrientes específicos sobre el sistema inmunológico

La información referente a como los distintos componentes de la dieta pueden afectar al sistema inmunológico es limitada. No obstante, hay algunos aspectos que merecen ser destacados.

Las proteínas de la dieta participan en el mantenimiento del sistema inmunológico y pueden influir sobre la respuesta a la infección (Millward, 1999). Algunos de los efectos de las proteínas de la dieta sobre el sistema inmunológico están mediados por sus aminoácidos componentes. Por ejemplo, la treonina y la cisteína, junto con otros aminoácidos, están implicados en la síntesis de glicoproteínas del mucus.

El glutatión (γ -glutamil-cisteinil-glicina) y los propios aminoácidos glicina y cisteína intervienen en la síntesis de proteínas celulares del sistema inmunológico manteniendo así la inmunocompetencia en general. Se ha descrito un descenso en los niveles de estos aminoácidos en la mucosa intestinal de animales privados de proteínas alimentarias (Coop y Holmes, 1996).

La glutamina es un aminoácido presente a concentraciones elevadas en músculo esquelético y parece tener un papel específico en el mantenimiento de la función proliferativa de linfocitos y enterocitos mucosales. Mantiene la síntesis de glutatión durante el trauma, tiene un efecto positivo en la prevención de la atrofia del GALT inducida por la administración intravenosa de nutrición parenteral total (Li *et al.*, 1998) y mejora la situación inmunológica en el intestino en situaciones de endotoxemia (Manhart

et al., 1999). En ratones estimulados con endotoxinas, la suplementación de la dieta con glutamina induce un incremento de células B y células T CD4+ en las Placas de Peyer.

La arginina actúa como precursor para la síntesis de óxido nítrico, un regulador de la función macrofágica y de adhesión y activación linfocitaria (Evoy *et al.*, 1998), y estimula la proliferación de linfocitos tímicos (Gil y Sánchez de Medina, 2005).

La taurina, un derivado de la cisteína, participa en la eliminación de productos de peroxidación y durante el desarrollo postnatal, de manera especial, tiene un papel como inmunomodulador del GALT (Redmon *et al.*, 1998).

En el desarrollo del sistema inmunológico intestinal de niños alimentados con lactancia materna actúan también proteínas y péptidos presentes en la leche humana con actividad inmunomoduladora, tales como las citocinas y la lactoferrina, y otras como el factor de crecimiento epidérmico que intervienen en el desarrollo de la mucosa intestinal (Lonnerdal, 2003).

Dentro de los componentes del nitrógeno no proteico, podemos destacar los nucleótidos de la dieta los cuales han demostrado ser beneficiosos para el metabolismo lipídico, la inmunidad y la regeneración hepática e intestinal (Sánchez-Pozo *et al.*, 1998; Gil, 2002). Tejidos que proliferan rápidamente, tales como el sistema inmunológico o la mucosa intestinal no son capaces de soportar totalmente las necesidades de requerimientos de nucleótidos celulares exclusivamente a través de la síntesis *de novo* y por ello utilizan preferentemente la vía de recuperación, salvando nucleósidos y nucleobases procedentes de sangre y de la dieta. Un suplemento exógeno de estos compuestos a través de la dieta puede ser esencial para sostener el crecimiento y mantener la función celular en estos tejidos (Uauy *et al.*, 1996).

Aunque no se conoce exactamente el mecanismo por el cual actúan sobre la respuesta inmunológica, los nucleótidos han sido implicados en la maduración, activación y proliferación de los linfocitos, la modificación de subpoblaciones linfocitarias, la actividad fagocítica de los macrófagos, el retraso de la hipersensibilidad y la modulación de la

producción de inmunoglobulinas (Rueda y Gil, 2000). También podrían estar implicados en la respuesta a la infección a través de la modulación de la microbiota intestinal (Gil *et al.*, 1986).

La suplementación de la dieta con nucleótidos parece ser esencial para soportar el crecimiento y mantener la función de la mucosa intestinal y el sistema inmunológico. Así, se ha descrito una menor incidencia de diarrea aguda en niños alimentados con fórmulas con nucleótidos añadidos frente a niños que no recibieron esa suplementación (Brunser *et al.*, 1994).

El intestino delgado parece tener un papel fundamental en la regulación ejercida por los nucleótidos sobre la respuesta inmunológica. Los enterocitos actúan como APCs y son capaces de producir citokinas implicadas en la activación, proliferación y diferenciación linfocitaria. Se ha descrito que los nucleótidos incrementan, de forma dosis-dependiente, la producción de IL-6 e IL-8 en explantes de intestino delgado fetal estimulados con IL-1 β . En ratones al destete, los nucleótidos de la dieta modifican las subpoblaciones de linfocitos intestinales; esta modulación podría ser uno de los mecanismos por los que los nucleótidos promueven la producción de inmunoglobulinas. Dicha modificación se ha observado como el incremento y adelanto en el tiempo de la expresión de marcadores de células B (CD22) y de células B1 (CD25), precursoras estas últimas de células plasmáticas intestinales y sistémicas productoras de IgA e IgM.. Por otro lado, los nucleótidos modulan a nivel intestinal la producción de IL-2 e IL-6, citokinas implicadas en la diferenciación de las células B hacia células plasmáticas productoras de IgA (Aggett *et al.*, 2003).

Diversos estudios clínicos llevados a cabo a lo largo de los últimos 15 años con distintos niveles de suplementación de nucleótidos; con niveles iguales o inferiores a 33 mg/l (Carver *et al.*, 1991; Brunser *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1996; Crosgrave *et al.*, 1996; Martínez-Augustin *et al.*, 1997); con niveles de 72 mg/l (Pickering *et al.*, 1998; Cordle *et al.*, 2002; Ostrom *et al.*, 2002; Yau *et al.*, 2003; Buck *et al.*, 2004) han mostrado evidencias acerca del efecto de los nucleótidos de la dieta sobre distintos parámetros clínicos en el neonato

(Hawkes *et al.*, 2005). Los resultados más importantes obtenidos en estos estudios fueron la influencia de los nucleótidos sobre la disminución de la incidencia y duración de episodios de diarrea, el incremento de la inmunidad humoral, fundamentalmente la concentración sérica de anticuerpos frente a diversos antígenos vacunales, así como de la inmunidad celular, a través del incremento de diversas subpoblaciones de células T relacionadas con la maduración del sistema inmunitario. Estas ventajas sobre la adición de nucleótidos a las fórmulas infantiles son tratadas de nuevo en el punto 1.3 (Lactancia materna vs. Lactancia artificial y su influencia sobre el sistema inmunológico).

Los lípidos de la dieta pueden modificar la composición en ácidos grasos de las membranas celulares, incluyendo las de los linfocitos, pudiendo así afectar a la respuesta inmunológica (Keusch, 1999).

Niveles elevados de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (AGPI n-3) reducen la proliferación linfocitaria (Terada *et al.*, 2001), mientras que cantidades moderadas podrían aumentar la función inmunológica (Field *et al.*, 2001). Se ha descrito que la suplementación de la dieta con AGPI n-3 reduce la expresión del complejo de histocompatibilidad de clase II en monocitos humanos, reduce también la expresión de moléculas de adhesión, afectando a la migración de linfocitos y monocitos entre compartimentos corporales (Hughes y Pinder, 1997, 2000). El ácido docosahexanoico aumenta el número de células de memoria y células T efectoras en niños prematuros (Field *et al.*, 2001). Muchos de los efectos de los AGPI n-3 en el sistema inmunológico están mediados por modificaciones en la producción de eicosanoides, como la producción de leucotrieno B₅ de menor actividad biológica o la reducción de la síntesis de PGE₂. La PGE₂ es un inhibidor de la producción de mediadores proinflamatorios por los macrófagos, modula la expresión de receptores MHC II en estas células e inhibe la proliferación linfocitaria. Independientemente de la regulación eicosanoide, los AGPI n-3 puede inhibir directamente la síntesis de citocinas proinflamatorias por células mononucleares humanas (Calder, 1997; Prescott y Calder, 2004).

Los AGPI n-3 presentes en la leche humana promueven la adhesión de bacterias beneficiosas a las superficies de la mucosa intestinal favoreciendo su correcto desarrollo. (Das, 2002)

Los hidratos de carbono en relación con el sistema inmunológico intestinal han sido poco estudiados. La mayor parte de la información disponible en este aspecto esta relacionada con la interacción entre los distintos tipos de fibra alimentaria y la microbiota intestinal.

La alimentación de ratas con dietas con fibra, tanto vía parenteral como enteral, reduce la translocación bacteriana y previene daños a la función inmunológica intestinal y sistémica (Xu *et al.*, 1998). Asimismo, la administración oral de glúcidos no digeribles altamente fermentables promueve la secreción de IgA en la mucosa del ciego, mientras que los no fermentables la reducen. En el ratón se ha descrito que la administración de fructooligosacáridos tiene un efecto positivo sobre la síntesis de IgA a nivel intestinal (Manhart y Roth, 2001).

Los oligosacáridos, han sido considerados agentes prebióticos capaces de modificar la microbiota intestinal, actuando así como inmunomoduladores (Gibson y Robertfroid, 1994); aunque actualmente no hay datos clínicos disponibles que avalen esta hipótesis (Kunz *et al.*, 2000). Los oligosacáridos presentes en la leche humana inhiben la adhesión de los neutrófilos y estimulan las células endoteliales vasculares (Klein *et al.*, 2000), sus funciones en la inhibición de la adhesión de patógenos específicos son comentadas más adelante en el punto 1.3 (Lactancia materna vs. Lactancia artificial y su influencia sobre el sistema inmunológico).

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos formados por una ceramida hidrofóbica y un oligosacárido hidrofílico con uno o más residuos de ácido siálico, además de otros azúcares. Aunque la función de los gangliósidos en la leche humana aún no ha sido bien establecida diversos estudios le confieren funciones varias:

Los gangliósidos parecen tener un papel biológico en el desarrollo de órganos. Durante la lactancia el patrón de distribución de los gangliósidos varia, siendo GD3 el gangliósido predominante en calostro, mientras que en la leche madura predomina el GM3. Estas elevadas concentraciones de GD3 en calostro, así como en tejidos en desarrollo, han sido asociadas a una posible función de éste como mediador en interacciones celulares específicas (Friedman *et al.*, 1983). GD1a y GD1 son marcadores de diferenciación para subpoblaciones Th1 y Th2, respectivamente (Ebel *et al.*, 1992), y diversos estudios sugieren que los gangliósidos pueden estar implicados en la activación de células T y en la diferenciación de varias subpoblaciones linfocitarias (Yuasa *et al.*, 1990; Nashar *et al.*, 1996).

Se les atribuye también una participación importante en la defensa contra la infección. Los gangliósidos actúan como falsos receptores inhibiendo las enterotoxinas de *E.coli* y *V. cholerae* (Otnaess *et al.*, 1983). La incorporación de gangliósidos en la dieta modifica la composición microbiana en heces de niños prematuros, disminuyendo el recuento de *E.coli* y aumentando el de bifidobacterias con respecto a los niños alimentados sin dicha suplementación (Rueda *et al.*, 1998). Los conjugados de ácido siálico podrían actuar como estructuras análogas a receptores para la adhesión bacteriana, alterando la microbiota intestinal del neonato y reduciendo la capacidad infecciosa de estas bacterias (Rueda *et al.*, 2003). Por otro lado, el efecto promotor sobre el crecimiento y la colonización por bifidobacterias descrito en niños alimentados con leche materna (Nakano *et al.*, 2001) y con fórmulas infantiles suplementadas con gangliósidos podría estar causado por la contribución del ácido siálico a un bajo pH intestinal (Rueda *et al.*, 2003).

Además, los gangliósidos de la dieta incrementan el número de células intestinales secretoras de IgA y el contenido luminal de IgA secretada. Asimismo, la suplementación de la dieta con gangliósidos determina un desarrollo temprano en el número de células secretoras de citocinas y un número significativamente mayor de linfocitos secretores de citocinas Th1 y Th2 en lámina propia y placas de Peyer. Por otro lado, GD3 aumenta la tasa de proliferación en todas las poblaciones linfocitarias intestinales, mientras que GM3 estimula la proliferación de los linfocitos intestinales excepto los de las placas de Peyer.

Todos estos resultados sugieren que los gangliósidos de la dieta influyen en el proceso de maduración del sistema inmunológico intestinal que tiene lugar durante la lactancia (Rueda *et al.*, 2003). Las ventajas sobre la adición de gangliósidos a las fórmulas infantiles son tratadas de nuevo en el punto 1.3 (Lactancia materna vs. Lactancia artificial y su influencia sobre el sistema inmunológico).

Los minerales como el hierro, el zinc, el cobre y otros se han relacionado con distintos efectos sobre el sistema inmunológico.

Una deficiencia de hierro, necesario para la síntesis de DNA, puede afectar a la proliferación linfocitaria y a la actividad de enzimas como la mieloperoxidasa. Sin embargo, un exceso del mismo disminuye la producción de H₂O₂ y reduce la actividad bactericida neutrofílica, aumentando así la susceptibilidad a la infección. Se ha descrito un descenso de los niveles de hierro circulante durante infecciones agudas (Keusch, 1999).

El zinc participa en la regulación de la expresión de genes de fase aguda de la respuesta inmunológica formando estructuras terciarias al unirse al RNA (dedos de zinc) implicadas en la estabilización conformacional de factores de transcripción del DNA, por lo que una deficiencia en este elemento podría disminuir la proliferación linfocitaria (Keusch, 1999). Recientemente se ha descrito que la suplementación de zinc en la dieta de niños infectados por *Shigella* incrementa la proliferación linfocitaria y la respuesta de IgG específica (Raqib, 2004). Otro papel del zinc en la respuesta inmunológica es su intervención, unido a péptidos derivados del timo, en la diferenciación de células T. Una deficiencia en zinc reduce las respuestas de hipersensibilidad retardada. Los niveles de zinc pueden afectar también a la producción y/o a la unión a la membrana de ciertas citocinas: IL-1, IL-2 e interferón (Keusch, 1999).

La deficiencia de cobre disminuye la producción de anticuerpos, la actividad fagocítica, la proliferación de células T y la producción de IL-2, aumentando el número de células B. Además, el cobre está implicado en el funcionamiento del complemento, la integridad de

las membranas celulares, la actividad de la Cu-Zn superoxidodismutasa y la estructura de las inmunoglobulinas (Kuvibidila *et al.*, 1993; Myrvik, 1994).

Niveles bajos de magnesio se han relacionado con alto número de células en el timo, un incremento de eosinófilos y de la producción de IL-1, IL-6, TNF- α e histamina. También se le ha relacionado con la producción de proteínas de la fase aguda de la respuesta inmunológica y la actividad del complemento. El magnesio influye en la citotoxicidad de los linfocitos a través de las interacciones con ATP y moléculas de adhesión (Kuvibidila *et al.* 1993; Myrvik, 1994).

El selenio contribuye a la integridad del sistema inmunológico y parece estar implicado en la respuesta a la infección. Cuando se añade en la dieta se ha observado un incremento en la concentración de IgG 2 en suero (Reilly, 1999).

La ingesta de molibdeno ha sido relacionada con un aumento de la respuesta inmunológica frente a infecciones por nematodos (McClure *et al.*, 1999).

Varias vitaminas han sido relacionadas con la respuesta inmunológica aunque su mecanismo de acción no siempre es bien conocido.

La vitamina A ha sido implicada en la modulación de la función inmunológica intestinal aumentando la incorporación de timidina en los linfocitos de la lámina propia, y vía IL-1 en la alteración del sistema inmunológico del colon (Elitsur *et al.*, 1997).

La vitamina D participa en la regulación positiva de la diferenciación celular y la apoptosis; y en la regulación negativa de la proliferación celular (Martínez-Agustín *et al.*, 2005). Se ha descrito un papel inhibitorio de la vitamina D en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, como la enfermedad inflamatoria intestinal (Cantorna *et al.*, 2004).

La suplementación con niveles de vitamina E superiores a los recomendados aumenta la inmunidad humoral y celular, así como la eficiencia de los fagocitos. Debido a sus propiedades antioxidantes a la vitamina E se le atribuye un efecto inmunoestimulador,

previniendo del daño oxidativo a las células inmunológicas o modulando la producción de metabolitos del ácido araquidónico (Sheehy y Morrissey, 1999).

1.3.- Lactancia materna vs. Lactancia artificial y su influencia sobre el sistema inmunológico

En la composición de la leche materna aparecen diversas sustancias que pueden afectar de manera directa o indirecta a la función inmunológica del niño alimentado con ella (Gil y Rueda, 2002). En la leche materna hay anticuerpos del tipo SIgA en cantidad considerable, capaces de reconocer microorganismos patógenos diversos: bacterias, virus y hongos (Goldman *et al.*, 1982; Goldman, 1993). La producción de estos anticuerpos es baja en el recién nacido (Rognum *et al.*, 1992). Estos anticuerpos podrían adquirir su especificidad por la migración de células B estimuladas por antígeno en las placas de Peyer en el intestino y en el tejido linfoide del tracto respiratorio hacia la lámina propia de la glándula mamaria, protegiendo al niño frente a los organismos patógenos a los que está expuesta su madre (Telemo y Hanson, 1996, Brandtzaeg y Johansen, 2005). También aparecen en la leche materna anticuerpos anti-idiotipo, este hallazgo concuerda con la mejora observada en la respuesta frente a vacunas en niños alimentados al pecho con respecto a los alimentados con fórmulas (Hahn-Zoric *et al.*, 1990; Pabst y Spady, 1990). En el calostro y al principio de la lactancia la leche materna contiene cantidades considerables de macrófagos y linfocitos T CD8+ (Wold y Hanson, 1994) que podrían actuar como inmunosupresores y reguladores negativos de las células T, respectivamente (Wold y Adlerberth, 1998). Los neutrófilos activados presentes en la leche humana podrían compensar la baja capacidad del recién nacido para el reclutamiento de neutrófilos en los lugares de inflamación en el intestino (Keeney *et al.*, 1993).

En la leche materna podemos encontrar cantidades importantes de lactoferrina (1.5 g/l), que está implicada en la defensa frente a la infección y tiene propiedades inmunotrópicas. Su capacidad para secuestrar exceso de iones Fe necesarios para el crecimiento de los

microorganismos parece ser un mecanismo importante de defensa en humanos. La lactoferrina incrementa la fagocitosis, la adherencia celular y controla la liberación de citokinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF α) por los macrófagos. Además, protege de los posibles daños causados por los radicales libres y promueve la maduración de células T y B. En ratones, la lactoferrina inhibe la respuesta autoinmune (Adamic y Wlaszczyk, 1996). También en ratones se ha descrito que la lactoferrina bovina induce la respuesta inmunológica sistémica y mucosal incrementando la secreción de IgG e IgA en las placas de Peyer y el bazo. La activación del sistema inmunológico de las mucosas podría depender de la fijación de la lactoferrina a la mucosa intestinal (Debbabi *et al.*, 1998). La lactoferricina, péptido N-terminal de la lactoferrina bovina y humana, ha mostrado una potente acción bactericida *in vitro* e *in vivo* (Teraguchi *et al.*, 1995)

La lisozima es una enzima activa que aparece en la leche humana en concentraciones altas (0.1-0.3 g/l); es capaz de degradar las paredes celulares de bacterias gram-positivas y podría tener una acción sinérgica con la lactoferrina (Lonnerdal, 2000).

La lacto-N-tetraosa, la lacto-N-fucopentaosa, la sialil-lactosa y disialil-lacto-N-tetraosa son los principales oligosacáridos complejos presentes en la leche humana (Stahl *et al.*, 1994) donde alcanzan concentraciones de 5-8 g/l (Kunz *et al.*, 2000). La capacidad secretora es diferente entre individuos, la expresión de distintas enzimas que intervienen en la síntesis de los oligosacáridos está determinada genéticamente, se han observado diferencias en la composición oligosacáridica de la leche humana a lo largo del periodo de lactancia (Kunz *et al.*, 2000). Sus funciones biológicas están estrechamente relacionadas con su estructura: un núcleo de lactosa sustituido con N-acetil-glucosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico en varios enlaces y posiciones. Aunque previamente habían sido asociados con la colonización intestinal por Bifidobacterias, actualmente no hay datos clínicos disponibles que avalen esta hipótesis. Los oligosacáridos parecen actuar como ligandos para moléculas de adhesión leucocitaria, y podrían afectar a la expresión de integrinas leucocitarias, permitiendo la migración de leucocitos a los lugares de inflamación (Kunz y Rudolff, 1993; Kunz *et al.*, 2000). Los oligosacáridos complejos presentes en la leche humana actúan también como falsos receptores a nivel intestinal y

previenen así la infección por diferentes microorganismos (Cervantes *et al.*, 1995). Posteriormente, se ha descrito una asociación entre la concentración de oligosacáridos fucosilados en la leche materna y la protección frente a diarrea moderada o severa causada por *Campylobacter*, calicivirus u otras causas mediante la inhibición de la unión de patógenos específicos a sus células diana (Morrow *et al.*, en 2004; Newburg *et al.*, 2005).

La leche materna también contiene factor de crecimiento epidérmico que puede favorecer la maduración de la barrera epitelial intestinal, disminuyendo la captación de antígenos y, por tanto, la estimulación inmunológica (Udall *et al.*, 1981). Otros componentes de la leche humana como: κ -caseína, fragmentos de subunidades de caseína, lactoperoxidasa y poliaminas han mostrado también tener acciones antimicrobiana y/o inmunoestimuladora *in vivo* e *in vitro*, aunque no se han estudiado en humanos (Lonnerdal, 2000).

Los nucleótidos y los gangliósidos, cuyo papel inmunomodulador ya se ha comentado previamente en el apartado de Inmunidad y Nutrición, también aparecen en la leche materna. El desarrollo de nuevas metodologías, TPAN (*Total potentially available nucleosides*) para la cuantificación exacta del contenido en nucleótidos en los fluidos biológicos, como la leche materna, han permitido un mejor conocimiento de la disponibilidad de estos nutrientes, cuya concentración previamente había sido subestimada, y apoyan la adición de nucleótidos a las fórmulas infantiles en cantidades superiores a las consideradas anteriormente (Aggett *et al.*, 2003).

La alimentación con leche materna o con fórmula infantil tiene efectos sobre el sistema inmunológico; diferentes componentes de la leche materna tienen acciones inmunomoduladoras sobre partes del sistema inmunológico aún en desarrollo, colaborando a que la respuesta frente a los estímulos sea adecuada (Lonnerdal, 2000). Se ha descrito una mayor activación basal de linfocitos en los niños alimentados con fórmula, reflejada por una mayor expresión de integrinas y respuesta proliferativa en ausencia de antígeno (Wold y Adlerberth, 1998). Una posible causa de esta diferencia podría ser la exposición de estos niños a una mayor variedad de proteínas alimentarias, aunque parece

poco probable. Otras dos posibilidades no excluyentes a tener en cuenta son: la presencia de factores anti-inflamatorios/ anti-proliferativos en la leche materna y una mayor exposición a productos bacterianos diferentes originados por una flora intestinal más diversa en los niños alimentados con fórmula (Gil y Rueda, 2002).

En la leche materna aparecen citocinas, tanto pro-inflamatorias (IL-1, TNF- α) como anti-inflamatorias (TGF- β , IL-10), que podrían modular el sistema inmunológico del recién nacido (Wold y Hanson, 1994). Las citocinas mantienen su actividad biológica en su paso a través del tracto gastrointestinal y pueden llegar al torrente circulatorio y afectar a las funciones inmunológicas, como se ha observado en experimentos con animales (Rollwagen y Baqar, 1996). Los macrófagos de la leche producen prostaglandina E₂ que, junto con las citocinas anti-inflamatorias y los receptores solubles para citocinas y quimiocinas también presentes (Buescher y Malinowska, 1996), ejercen una regulación negativa sobre la proliferación linfocitaria. El TGF- β puede provocar el cambio de isotipo hacia células B IgA⁺ y la IL-6 puede estimular la síntesis de IgA e IgM así como promover la diferenciación de las células B IgA⁺ hacia células plasmáticas productoras de IgA (Strober y Ehrhardt, 1994).

La alimentación con leche materna o con fórmula infantil afecta a la respuesta frente a vacunas orales y parenterales; los niños alimentados con lactancia materna producen más SIgA en saliva y heces frente al toxoide tetánico y polio que los alimentados con fórmula (Hahn-Zoric *et al.*, 1990). Se ha observado que los niños con lactancia materna están protegidos a largo plazo frente a infecciones por *H.Influenzae* (Hanson *et al.*, 1995). Nutrientes particulares como suplementos proteicos o vitamina A han sido considerados como posibles adyuvantes en la inmunización (Solomons y Keusch, 2000). En un estudio con niños inmunizados con la vacuna Hib-conjugada y alimentados con una fórmula infantil suplementada con nucleótidos mostraron una respuesta superior (doble) frente al polisacárido tipo B de *H.Influenzae* con respecto a los que no recibieron esa suplementación (Pickering *et al.*, 1998).

Esta influencia de la alimentación con leche materna o con una fórmula suplementada con nucleótidos sobre el desarrollo de la inmunidad frente a determinados antígenos vacunales ha sido corroborada en otros estudios posteriores (Ostrom *et al.*, 2002; Schaller *et al.*, 2004; Hawkes *et al.*, 2005).

La leche humana, a través de la transferencia de inmunocitos, induciría tolerancia oral, proporcionando un efecto protector a largo plazo, explicando así el menor riesgo de desarrollar diabetes tipo I, dermatitis atópica, linfomas y enfermedad de Crohn, y la supervivencia incrementada en trasplantes renales maternos (Dosch *et al.*, 1993; Sigurs *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1988; Koletzko *et al.*, 1989; Campbell *et al.*, 1984). Diversos estudios epidemiológicos han asociado la introducción de una fórmula infantil basada en leche de vaca con un incremento del riesgo de desarrollar diabetes tipo I a lo largo de la vida. Aunque no se ha demostrado relación causa-efecto, estudios animales y epidemiológicos sugieren que otras fuentes proteicas complejas podrían ser diabetogénicas. El estado inmunorregulador del intestino y la respuesta de tolerancia o sensibilización frente a los antígenos de la dieta son factores críticos a tener en cuenta (Kolb y Pozzilli, 1999).

En resumen el tratamiento de los antígenos por el sistema inmunológico de la mucosa intestinal es fundamental para el desarrollo de una inmunidad efectiva; en dicho desarrollo, la leche materna además de proteger reduce respuestas inmunológicas adversas relacionadas con atopia, autoinmunidad y desordenes linfoproliferativos (Cripps y Gleeson, 1999).

2.- Alergia

Las enfermedades alérgicas constituyen una causa importante de morbilidad en los países industrializados, habiendo crecido su incidencia de forma alarmante durante las últimas décadas. Se generan como respuestas inmunológicas aberrantes frente a alérgenos ambientales (Stone, 2003).

Johanson *et al.* en 2001 realizaron una revisión de la nomenclatura utilizada en la alergia y reacciones relacionadas estableciendo las siguientes definiciones:

Hipersensibilidad: Reacción que causa síntomas o signos objetivamente reproducibles que se inician por exposición a un estímulo definido a una dosis tolerada por sujetos normales.

Alergia: Hipersensibilidad inmunológicamente mediada. Puede dividirse en IgE-mediada y no-IgE-mediada. La respuesta no mediada por IgE puede serlo por anticuerpos alérgeno-específicos tipo IgG, IgA o IgM, o por células, donde los linfocitos inmunológicamente sensibilizados tienen un papel fundamental.

Atopia: Alergia IgE-mediada. Tendencia personal o familiar a producir anticuerpos IgE en respuesta a dosis bajas de alérgenos y desarrollar síntomas típicos.

Una reacción atópica implica la producción de IgE alérgeno específica, la cual se une a receptores de alta afinidad en la superficie de mastocitos y basófilos que típicamente se localizan en las superficies mucosales y perivasculares. El reencuentro de la IgE de la superficie del mastocito o basófilo con el alérgeno provoca la degranulación de la célula que vierte mediadores proinflamatorios preformados al ambiente extracelular, como histamina, proteasas y proteoglicanos. Dependiendo de los órganos diana afectados aparecen manifestaciones diferentes como: Asma, rinitis, dermatitis atópica o síntomas gastrointestinales (Marshall, 2004).

El desarrollo de las enfermedades alérgicas depende de la interacción compleja de factores genéticos y ambientales (Stone, 2003; Marshall, 2004; Wright, 2004.). Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que el riesgo de sufrir enfermedades alérgicas es hereditario. La existencia de antecedentes familiares de alergia constituye un factor de riesgo. Así, se ha estimado que cuando uno de los padres padece alergia al menos el 30% de sus hijos la padecerán, esta proporción se eleva al 50 % cuando ambos padres son alérgicos (Duffy, 2001). Esta predisposición está causada por múltiples genes. Se han identificado algunos, como TIM 1 localizado en la región cromosómica 5q33, que codifica

un receptor de superficie celular para el virus de la hepatitis A y parece intervenir en la diferenciación de las células T hacia Th1 o Th2 (Kuchroo, 2003). Las regiones cromosómicas 6p y 12q aparecen consistentemente ligadas a manifestaciones fenotípicas como: niveles elevados de IgE, hiporrespuesta bronquial, asma, sensibilización alérgica o eosinofilia, aunque se han relacionado hasta otras 20 regiones cromosómicas (Wjst, 1999).

Se ha estudiado la influencia relativa de cada uno de los padres y parece haber una transmisión preferencial de la enfermedad atópica a través de la madre, que pudiera estar causada por la transferencia transplacentaria de antígenos, anticuerpos y/o citocinas de procedencia materna (Litonjua *et al.*, 1998). Se han establecido relaciones entre la respuesta de células de sangre del cordón umbilical tras el nacimiento frente a estímulos alérgicos con la exposición de la madre a esos alérgenos durante el embarazo (Warner *et al.*, 1997).

La exposición a diversos factores ambientales y los patrones de infección influyen en el desarrollo de atopia (Stone, 2003). Estudios epidemiológicos han mostrado una incidencia incrementada de las enfermedades atópicas en las áreas urbanas, relacionada con la pobre calidad del aire, la exposición a alérgenos dentro del hogar y estilos de vida con un alto grado de estrés (Call *et al.*, 1992; Gereda *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2003).

Se ha descrito que los contaminantes atmosféricos aumentan la producción de IgE alérgeno-específica y alteran el equilibrio entre las subpoblaciones de células T (Kemeny *et al.*, 2000; van Zijverden *et al.*, 2000). Algunos estudios sugieren que la presencia de mascotas en el interior del hogar tiene un efecto protector en el desarrollo de atopia; sin embargo, en niños con antecedentes de asma materna provocan el efecto contrario (Celedon *et al.*, 2002). La exposición a alérgenos durante la infancia puede aumentar el riesgo de sufrir atopia pero depende del tiempo de exposición, la dosis recibida y la susceptibilidad del individuo (Wright, 2004).

La “hipótesis higiénica”, formalmente postulada por Strachan en 1989, sugiere que un ambiente más higiénico y una menor exposición a infecciones durante la infancia pueden

ser las responsables del incremento de las enfermedades atópicas observado en las últimas décadas (Stone, 2003). Sin embargo, los mecanismos por los cuales sucede no están claros. El papel de las células Th2 en la inmunopatogénesis de la atopia está bien documentado. La interpretación inicial de la “hipótesis higiénica” propone que debido a la falta de estimulación de las células de la inmunidad natural por productos bacterianos estas producen menos IL-12 e interferón causando una desviación de la respuesta inmune alérgico-específica de un perfil Th1 a Th2 (Romagnani, 1994). Recientemente se ha propuesto también que la causa podría ser una reducción de la actividad de células T reguladoras (Wills-Karp *et al.*, 2001). Tanto los datos epidemiológicos como los resultados experimentales disponibles sugieren que ambos mecanismos podrían estar implicados (Romagnani, 2004).

2.1.- Tolerancia oral

Frente a los alimentos se produce normalmente una hipo-respuesta inmunológica intestinal. Aunque los antígenos alimentarios penetren intactos de manera rutinaria en el tracto gastrointestinal, es infrecuente que induzcan síntomas clínicos a causa del desarrollo de tolerancia en la mayoría de los individuos. Los mecanismos inmunológicos implicados en el desarrollo de tolerancia oral no se conocen completamente, pero estudios recientes sugieren que varias células presentadoras de antígeno, especialmente las células epiteliales intestinales, células dendríticas y células T reguladoras tienen un papel fundamental (Mowat, 2003).

Se han identificado cinco tipos de células reguladoras en relación con la inmunidad intestinal (Mowat, 2003):

- células Th3, una población de células CD4+ que segregan TGF- β .
- células Tr1, células CD4+ que segregan IL-10
- células T reguladoras, CD4+ CD25+
- células T CD8+ supresoras
- células T ? d

Independientemente de cual sea la vía de entrada de un antígeno (a través de las placas de Peyer o a través del epitelio que cubre la lámina propia), usualmente va a interactuar con una APC, y esta va a presentar dicho antígeno a una célula T colaboradora CD4+ nativa. Una vez que se produce dicho proceso las células CD4+ estimuladas por el antígeno pasan al torrente sanguíneo, vía conducto torácico, pero este proceso, a su vez es diferente en función de la naturaleza del antígeno.

Cuando se trata de organismo invasivo o patógeno, se induce un fenómeno de inflamación local debido a los efectos derivados de patógenos mediados a través de receptores llamados “Toll-like receptors” (TLR) que son expresados por células mesenquimales, macrófagos y células epiteliales. Como resultado, las células dendríticas de las placas de Peyer o de la lámina propia maduran completamente tras capturar el antígeno y producen IL-2, la cual va a favorecer la diferenciación de células CD4+ nativas fundamentalmente hacia células Th1 que producen IFN- γ y más inflamación, aunque también estas células dendríticas van a favorecer la diferenciación hacia células Th2 que producen citocinas como IL-4, e IL-5, las cuales promueven la respuesta local de IgA.

Cuando por el contrario, proteínas alimentarias y productos de bacterias comensales son capturados por células dendríticas, en ausencia de inflamación, otros factores tales como PGE₂, producida por células mesenquimales y macrófagos, y TGF- β producido por células epiteliales, promueven la maduración parcial de células dendríticas (células no profesionales). Estas células presentan el antígeno a células T CD4+ y estas se diferencian hacia células T reguladoras que producen fundamentalmente IL-10 y células Th3 que producen TGF- β . Las consecuencias inmunológicas de este proceso son la estimulación de la producción local de IgA, tolerancia sistémica y homeostasis inmunológica local.

Este fenómeno, denominado como tolerancia oral, ocurre normalmente tras la exposición a un antígeno alimentario y juega un papel fundamental en la prevención de la alergia alimentaria. Cuando se produce un desequilibrio en este proceso, especialmente en neonatos y niños pequeños con elevado riesgo alérgico, la exposición a una concentración elevada de proteínas extrañas puede incrementar el riesgo de

sensibilización desencadenando la respuesta de tipo alérgico, que se conoce como alergia alimentaria.

En los últimos años se ha incrementado el interés sobre como la microbiota intestinal comensal afecta a la respuesta inmunológica intestinal. Se ha estimado que hay 10^{12} a 10^{14} bacterias por gramo de tejido de colon, sugiriendo que hay más bacterias en el colon que células en el cuerpo (Mayer, 2003). La microbiota intestinal queda completamente establecida en las primeras 24 horas tras el nacimiento, es relativamente estable a lo largo de la vida y depende de la flora materna, la genética y el ambiente local.

La importancia de la microbiota intestinal en el desarrollo de la inducción de tolerancia oral se ha sugerido por el hecho de que ratones crecidos en un ambiente libre de gérmenes desde el nacimiento fallan en el desarrollo de la tolerancia normal (Sudo *et al.*, 1997).

Estudios recientes sugieren que los probióticos podrían prevenir la dermatitis atópica, pero no se ha demostrado que puedan prevenir la alergia alimentaria (Rautava *et al.*, 2002; Kalliomaki *et al.*, 2003). Estos resultados estarían de acuerdo con la hipótesis higiénica, anteriormente referida.

2.2.- Alergia alimentaria

La incidencia de la alergia alimentaria como la de otros desordenes alérgicos parece ir en aumento en los países industrializados; aunque el estudio mediante encuestas sobrestima el número real de afectados por las enfermedades alérgicas, se ha estimado que del 3.5 al 4% de los estadounidenses sufren de alergia a algún alimento (Munoz-Furlong *et al.*, 2004).

La prevalencia de las hipersensibilidades alimentarias es mayor en los primeros años de vida. Aproximadamente entre un 6% y un 8% de los menores de 3 años se ven afectados, aunque este porcentaje desciende a lo largo de los primeros diez años de vida (Bock, 1987).

La alergia a la leche de vaca es la más común en niños menores de un año (2-6 %), posiblemente porque ésta es usualmente la primera fuente de proteínas a la que se exponen (Hill *et al.*, 1997; Exl y Fritsche, 2001; Garcia-Ara *et al.*, 2004). En Estados Unidos el 2.5% de los niños menores de 5 años son alérgicos a la leche de vaca, el 1.3 % al huevo y el 0.8% al cacahuete (Sampson, 2005). En España los alimentos causantes de la mitad de las reacciones alérgicas en niños menores de 2 años son el huevo, la leche de vaca y el pescado, por ese orden (Martín-Esteban y Pascual, 1999). El 80% de estos niños desarrolla tolerancia clínica antes de cumplir los 5 años (Sampson, 1999). Las reacciones alérgicas a las proteínas de la leche de vaca están mediadas por IgE en un 60% de los casos; de estos niños atópicos el 25% continua siéndolo a los 20 años, y de éstos aproximadamente un tercio sufre reacciones a otros alimentos (Host, 1997).

La alergia alimentaria es una respuesta anómala del sistema inmunológico de las mucosas frente a las proteínas de los alimentos. A diferencia del sistema inmunológico sistémico que reacciona enérgicamente frente a cantidades relativamente pequeñas de antígeno, el sistema inmunológico de las mucosas encuentra diariamente cantidades enormes de estos, generalmente suprime la reactividad frente a los antígenos inocuos a la vez que es capaz de reaccionar y proteger al organismo frente a los patógenos (Sampson, 2004).

A pesar de que la diversidad de la dieta es enorme sólo unos pocos alimentos son causantes de la mayoría de las alergias alimentarias en el mundo. En niños la alergia alimentaria es causada principalmente por leche, huevo y cacahuete, en adultos también se han descrito reacciones frente a nuez, cacahuete, pescado y marisco. Los hábitos dietéticos regionales y los métodos de preparación de los alimentos influyen de manera importante en la prevalencia de las alergias, ya que pueden modificar los epítomos haciéndolos reconocibles o no por los anticuerpos (Hugh y Sampson, 2004).

La sensibilización a alérgenos alimentarios puede ocurrir en el tracto gastrointestinal, constituyendo la alergia alimentaria clásica o de tipo I, o como consecuencia de una sensibilización a alérgenos inhalados, alergia alimentaria de clase II (Breiteneder *et al.*,

2000). La mayoría de los alérgenos identificados como de clase I son glicoproteínas solubles en agua de 10 a 70 KDa, bastante estables frente a calor, ácidos y proteasas (Sampson, 1999). Los de clase II son proteínas producidas por las plantas que tienen reactividad cruzada con el polen.

La alergia a la leche de vaca es un desorden complejo a menudo confundido por el público general con la intolerancia, principalmente a la lactosa. Se trata de problemas distintos con mecanismos diferentes, como se definió en el punto 2 la alergia implica una reacción mediada por el sistema inmunológico.

La mayoría de las proteínas de la leche de vaca son alérgenos potenciales, incluso las que se encuentran en muy baja concentración (Wal, 2002). La tabla 1 muestra los pesos moleculares, porcentaje de hidratos de carbono y concentración porcentual de las principales proteínas lácteas: caseína, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, albúmina de suero bovino e IgG (Wahn, 1988).

Tabla 1: Alérgenos en la leche de vaca. (Wahn, 1988)

Proteína	Peso Molecular (KDa)	% Hidratos de Carbono	% del total de proteínas
caseína	20-30		82
β -lactoglobulina	18.3	0.1	9
α -lactoalbúmina	14.2		3
albúmina de suero	67		1
IgG	160	2-12	2

Las proteínas de la leche de vaca contienen a lo largo de sus moléculas epítomos lineales y conformacionales. Parece haber pequeños fragmentos localizados en las regiones hidrofóbicas altamente conservados en la evolución, que podrían ser los responsables de las reacciones cruzadas con proteínas de leche de otros mamíferos (Wal, 2002).

No se ha podido establecer asociación alguna entre estructura y/o función de las proteínas de la leche de vaca y su alergenicidad (Wal, 2002). Tan sólo varios trabajos muestran diferencias entre los epítomos reconocidos por IgE e IgG de pacientes con alergia transitoria frente a pacientes con alergia persistente a las proteínas de la leche de vaca (Chatchatee *et al.*, 2001; Jarvinen *et al.*, 2001; Vila *et al.*, 2001).

Los individuos alérgicos a los alimentos manifiestan síntomas variados en el tracto gastrointestinal, la piel y el tracto respiratorio.

La reacción frente a los alérgenos de clase II, reacción mediada por IgE a proteínas vegetales en individuos sensibilizados a pólenes, se conoce como síndrome alérgico oral y se caracteriza por inflamación de las mucosas oral y faríngea. La anafilaxia intestinal esta también mediada por IgE, y típicamente se presenta como náuseas, dolor cólico abdominal y vómitos, los cuales generalmente aparecen conjuntamente con manifestaciones en otros órganos (Sampson, 1999).

La esofagitis y la gastroenteritis alérgica eosinofílica pueden estar mediadas por IgE, por células o por ambos mecanismos, y se caracterizan por la infiltración de eosinófilos en esófago, estómago y paredes intestinales (Sampson *et al.*, 2001; Rothenberg *et al.*, 2001). La esofagitis alérgica eosinofílica es más frecuente en la infancia, donde se presenta con náuseas, vómitos y dolor epigástrico. La gastroenteritis alérgica eosinofílica no tiene una edad característica de aparición; se produce pérdida de peso y, dependiendo de la extensión y localización de la inflamación, pueden aparecer dolor abdominal, vómitos, diarrea, sangre en heces, anemia y enteropatía con pérdida proteica (Kelly, 2000).

La proctocolitis inducida por alergia alimentaria está causada por un mecanismo mediado por células. Aparece en los primeros meses de vida como reacción frente a proteínas, fundamentalmente de leche de vaca o de soja, presentes en las fórmulas infantiles o que llegan a través de la leche materna (Lake, 2000). El crecimiento no se ve afectado; aparece edema de la mucosa con infiltración de eosinófilos en el epitelio y la

lámina propia del intestino grueso distal, siendo lo más característico la presencia de sangre en heces (Rothenberg, 2004).

El síndrome de enterocolitis se presenta en niños menores de 3 meses como consecuencia de una reacción también mediada por células frente a las proteínas de leche de vaca o de soja. En niños que reciben lactancia materna la aparición de los síntomas es más tardía coincidiendo con la introducción de estos nuevos alimentos (Nowak-Wegrzyn *et al.*, 2003). Normalmente se producen vómitos entre 1 y 3 horas después de la ingesta del alérgeno. En los primeros meses de vida las proteínas de los alimentos pueden causar también enteropatía mediada por células; las vellosidades sufren atrofia y se produce infiltración de células mononucleares y eosinófilos. Los niños padecen diarrea y muestran poca ganancia en peso (Savilahti, 2000).

Las manifestaciones cutáneas mediadas por IgE más comunes causadas por las reacciones alérgicas a los alimentos son urticaria aguda y angioedema. También es frecuente la urticaria aguda de contacto frente a carnes, vegetales y frutas. La dermatitis atópica puede estar mediada por IgE o por células; es una forma de eczema que aparece generalmente en la infancia temprana, y se caracteriza por una distribución típica y prurito intenso (Bieber *et al.*, 1996). Otras manifestaciones de alergia alimentaria mediada por células son la dermatitis de contacto observada en manipuladores de alimentos (Judd, 1994) y la dermatitis herpetiforme asociada a la enteropatía causada por la sensibilización al gluten (Nicolas *et al.*, 2003).

Los síntomas respiratorios agudos causados por alergia a alimentos son generalmente reacciones aisladas mediadas por IgE, mientras que los síntomas crónicos aparecen como consecuencia de reacciones mixtas mediadas por IgE y por células. La rinoconjuntivitis y el asma no aparecen aislados como reacción frente a la ingesta de alimentos, pero si junto con otros síntomas propios de la alergia alimentaria (James, 1994). Además, la ingesta de pequeñas cantidades de alérgenos alimentarios en individuos sensibilizados puede empeorar el asma e inducir hiperreactividad de las vías respiratorias (James *et al.*, 1996). Los vapores emitidos al cocinar los alimentos pueden contener proteínas y causar

reacciones asmáticas e incluso anafilaxia (Roberts *et al.*, 2002). La reacción alérgica a las proteínas de la leche de vaca mediada por células puede causar una forma rara de hemosiderosis pulmonar conocida como síndrome de Heiner (Lee *et al.*, 1978).

La alergia a los alimentos es la causa de al menos un tercio de las reacciones de anafilaxia sistémica incluyendo una variedad de los síntomas gastrointestinales, cutáneos y respiratorios descritos previamente y síntomas cardiovasculares como hipotensión, colapso vascular y disritmias cardíacas (Bock *et al.*, 2001). Esta reacción puede llegar a ser fatal, conduciendo a la muerte del individuo.

3.-Prevención y tratamiento de la alergia alimentaria

Cuanto más temprana es la intervención más probabilidades de éxito habrá a la hora de evitar la sensibilización de los niños con alta predisposición genética a desarrollar alergia. Diversos estudios apoyan la existencia de un periodo crítico, incluso prenatal, en el que el riesgo de sensibilización para estos niños es muy elevado. Algunos factores susceptibles de ser modificados son: la alimentación con fórmulas infantiles, la introducción temprana de alimentos alérgicos, la exposición a humo de tabaco o el desconocimiento de los padres sobre la enfermedad (Zeiger, 2003).

Aunque se han encontrado marcadores genéticos (Cookson *et al.*, 1989) y factores inmunológicos asociados al desarrollo de alergia alimentaria, la herramienta más práctica y recomendada para la detección de niños con alto riesgo de desarrollar la enfermedad es el historial de antecedentes familiares (Zeiger, 2003).

El Comité Nutricional de la Academia Americana de Pediatría (AAP) identifica como individuos con alto riesgo de desarrollar alergia alimentaria aquellos con ambos padres o un padre y un hermano afectados (AAP, 2000). El criterio propuesto por la Sociedad Europea de Alergología Pediátrica e Inmunología Clínica (ESPACI) y la Sociedad

Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN)(Host *et al.*, 1999) es menos restrictivo e identifica como individuos con alto riesgo de desarrollar alergia alimentaria aquellos con sólo un familiar en primer grado afectado.

Se han observado en el feto y el recién nacido respuestas frente a alimentos mediadas por IgE y frente a las proteínas de la leche y el huevo mediadas por células T (Michel *et al.*, 1980, Warner *et al.*, 1994). Como intento para la prevención de la alergia a las proteínas del huevo y la leche, se ha estudiado el efecto de la eliminación de estos alimentos en la dieta de la madre durante el tercer trimestre de embarazo, sin que se haya logrado reducir con ello la sensibilización en sus hijos.

Ninguno de los comités mencionados recomienda la eliminación de alimentos esenciales como el huevo y la leche en la dieta de la madre durante el embarazo. La AAP si recomienda la eliminación del cacahuete en la dieta materna, ya que no se trata de un alimento esencial y existen estudios epidemiológicos que sugieren que la ingesta de éste durante el embarazo puede aumentar el riesgo de desarrollar alergia al cacahuete en el recién nacido (Frank *et al.*, 1999).

Tanto la AAP como la ESPACI y la ESPGHAN recomiendan la alimentación exclusiva y prolongada con leche materna, hasta el cuarto o sexto mes de vida, ya que ésta proporciona la nutrición ideal para el desarrollo inmunológico y fisiológico del recién nacido (Zeiger, 2003).

3.1.- Lactancia materna y prevención de atopia

El papel de la duración de la lactancia materna y/o la supresión de fórmulas infantiles basadas en leche de vaca durante la infancia temprana en el desarrollo de enfermedad atópica continua siendo controvertido (Lonnerdal, 2000). Un grupo de expertos, en una revisión relativamente reciente sobre la bibliografía disponible, alcanzó conclusiones

diferentes sobre los efectos de la alimentación temprana en el desarrollo de alergia para los niños con riesgo hereditario de sufrirla.

En general, la alimentación exclusivamente con lactancia materna reduce el riesgo de asma, y el riesgo de respiración sibilante recurrente asociada normalmente a infecciones virales. Los efectos protectores de la lactancia materna se incrementan hasta los 4 meses con el incremento de la duración de la misma y persisten durante la primera década de la vida. La alimentación al pecho protege frente al desarrollo de dermatitis atópica y la exposición a pequeñas dosis de leche de vaca durante los primeros días de vida parece incrementar el riesgo de alergia a leche de vaca pero no afecta a la incidencia de enfermedades alérgicas posteriormente.

Los efectos beneficiosos de la lactancia materna son particularmente positivos en niños con antecedentes familiares de alergia. No obstante, en la leche materna aparecen también alérgenos procedentes de la dieta de la madre: β -lactoglobulina, caseína y γ -globulina, ovoalbúmina, gliadina y antígenos del cacahuete en concentración suficiente para estimular reacciones alérgicas en los niños (ng/ml). Estos alérgenos aparecen entre 1 y 6 horas después de haberlos ingerido la madre independientemente del estado atópico de esta. Además, se ha observado sensibilización temprana de niños alimentados exclusivamente con lactancia materna frente a proteínas de huevo y de leche de vaca.

Diferentes estudios han evaluado el efecto de la eliminación de la dieta materna de alimentos alérgicos durante la lactancia sobre la prevención de enfermedades alérgicas en niños de alto riesgo (Hattevig *et al.*, 1989; Hattevig *et al.*, 1999; Chandra *et al.*, 1989). En uno de ellos se observó una reducción de eczema hasta los 18 meses, aunque a los 10 años no había diferencias en manifestaciones alérgicas. Otros estudios llegan a conclusiones contradictorias.

La AAP recomienda la eliminación de nueces y cacahuetes en la dieta materna durante la lactancia y considera la posibilidad de eliminar huevos, leche y pescado. Los comités europeos (la ESPACI y la ESPGHAN) en cambio, no recomiendan eliminar alimentos

alergénicos de la dieta materna debido a los resultados contradictorios de los estudios existentes. La mejor opción sería la consideración individual de cada caso en función del riesgo de alergia y otras circunstancias. La eliminación del cacahuete de la dieta materna durante la lactancia se considera de forma especial y se recomienda, ya que este no es un alimento esencial y es causante frecuente de alergias (Zeiger, 2003).

3.2.- Utilización de fórmulas infantiles como alternativa a la lactancia materna.

En muchos casos se hace necesario sustituir o suplementar la leche materna con una fórmula infantil, cuyo valor nutricional debe ser lo más semejante posible al de la leche humana y además no debe inducir sensibilización a alérgenos alimentarios (Exl, 2001).

Los productos dietéticos infantiles con alergenidad reducida disponibles en el mercado son mezclas de aminoácidos o provienen de distintas fuentes de proteínas. Estas proteínas son usualmente de leche de vaca o de soja y han sido sometidas a hidrólisis enzimática, tratamiento térmico o ultrafiltración. Las mezclas de aminoácidos puros son las únicas consideradas no alérgicas (Host y Halken, 2004).

Las proteínas de soja son consideradas menos inmunogénicas y alérgicas que las de la leche de vaca (May *et al.*, 1980; McLaughlan *et al.*, 1981) y la prevalencia de alergia a estas proteínas en niños con alergia alimentaria es baja (<5%) (Burks *et al.*, 1998; Bruno *et al.*, 1997), incluso en niños con antecedentes familiares de alergia que han sido alimentados desde el nacimiento con fórmulas basadas en soja (0.5%) (Bruno *et al.*, 1993). No obstante, no se ha observado en estudios prospectivos aleatorios que estas fórmulas protejan frente al desarrollo de alergia alimentaria o de dermatitis atópica (Chandra *et al.*, 1989). Tanto la AAP (AAP, 1998) como la ESPACI y la ESPGHAN (Host *et al.*, 1999) consideran que no hay evidencias suficientes para recomendar las fórmulas basadas en proteínas de soja para la prevención de la alergia alimentaria.

En cuanto a las fórmulas basadas en proteínas de leche de vaca, desde el punto de vista de composición, se distinguen dos tipos fundamentales de hidrolizados de proteínas lácteas: de caseína y de proteína sérica, entendiendo como proteína sérica a la mezcla de proteínas contenidas en el suero de la leche (fracción obtenida tras la precipitación de la caseína) y que incluye fundamentalmente β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, albúmina de suero bovino e IgG.

Por otro lado, el grado de hidrólisis puede variar. No existe un criterio unánime para la clasificación en función de este parámetro. Existen productos basados en hidrolizados extensivos de proteínas lácteas (50-55% de grado de hidrólisis) que raramente se han asociado con reacciones adversas y cuyo principal inconveniente es el sabor amargo generado por péptidos de pequeño tamaño; en estos productos se han detectado cantidades bajas de β -lactoglobulina residual (0.84 – 14.5 $\mu\text{g/l}$) (Makinen-Kiljunen *et al.*, 1993; Rosendal *et al.*, 2000).

Con los objetivos de inducir el desarrollo de tolerancia oral a los alérgenos de la leche de vaca y de mejorar las características organolépticas de este tipo de fórmulas se han desarrollado productos con una base proteica menos hidrolizada (12-15% de grado de hidrólisis), pero estos hidrolizados parciales de proteínas lácteas no son considerados seguros para niños alérgicos a las proteínas de la leche de vaca o con alto riesgo de serlo. En estos hidrolizados aparecen cantidades muy superiores de β -lactoglobulina residual hasta 12400 $\mu\text{g/l}$. (Makinen-Kiljunen *et al.*, 1993; Rosendal *et al.*, 2000).

Una fórmula puede considerarse hipoalérgica si muestra una tolerancia clínica del 90 % en niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca mediada por IgE, con un intervalo de confianza del 95 % (ESPGHAN, 1993; Host *et al.*, 1999).

Varios estudios han mostrado una reducción significativa de la sensibilización/alergia frente a la leche de vaca, así como de la dermatitis atópica utilizando hidrolizados de proteínas lácteas, tanto extensivos como parciales en la alimentación infantil, bien como alimento único o bien como suplemento a la lactancia materna, al compararlos con

fórmulas basadas en leche de vaca o soja. Las fórmulas basadas en mezclas de aminoácidos no se han utilizado en la prevención primaria de la alergia.

El efecto beneficioso de la alimentación con hidrolizados proteicos es particularmente importante cuando esta se instaura antes de los 6 meses de edad. Si hasta entonces el niño se ha alimentado exclusivamente con leche materna la introducción de la fórmula hidrolizada no añade efecto preventivo frente a la alergia. El efecto protector de las fórmulas basadas en hidrolizados extensivos de proteínas lácteas ha mostrado ser mayor que el de las fórmulas basadas en hidrolizados parciales en varios estudios (Oldaeus *et al.*, 1997; Halcken *et al.*, 2000).

3.3.- Pautas de prevención de la alergia alimentaria

Tanto la AAP como la ESPACI y la ESPGHAN, teniendo en cuenta los estudios existentes, recomiendan la utilización de fórmulas basadas en hidrolizados de proteínas lácteas para la prevención de la alergia alimentaria en niños con alto riesgo de desarrollarla cuando la lactancia materna no es posible o no es suficiente.

Concretamente, la AAP sugiere la utilización de fórmulas fabricadas con hidrolizados extensivos, y considera la posibilidad de utilizar también las preparadas con hidrolizados parciales, mientras que los comités europeos recomiendan una fórmula con alergenicidad reducida confirmada.

Además de las diferencias en antigenicidad y características organolépticas, mencionadas previamente, entre las fórmulas basadas en hidrolizados extensivos y las basadas en los parciales existen diferencias de coste. Mientras que una fórmula con proteína extensivamente hidrolizada tiene un coste superior en aproximadamente unos 3 dólares por día con respecto a una fórmula convencional basada en leche de vaca, las fórmulas basadas en hidrolizados parciales no implican un aumento apreciable del coste. No

obstante, cuando el factor económico no es un obstáculo se recomienda el uso de las fórmulas con proteínas extensivamente hidrolizadas (Zieger, 2003).

La introducción temprana en la dieta de otros alimentos parece aumentar el riesgo de alergias. Se ha descrito una relación lineal significativa entre la introducción de alimentos sólidos en la dieta desde el nacimiento hasta el cuarto mes y la incidencia de eczema a los 2 años y de eczema crónico o recurrente a los 10, siendo el efecto especialmente notable en hijos de individuos con alergia. Esta asociación parece estar causada, más que por un alimento en concreto, por la diversidad de la dieta (Fergusson *et al.*, 1983; Kajosaari *et al.*, 1991).

Tanto la AAP como la ESPACI y la ESPGHAN recomiendan retrasar la introducción de alimentos sólidos en la dieta hasta el 5º (ESPACI y ESPGHAN) o 6º mes (AAP).

Los comités europeos sugieren incorporar un número limitado de alimentos con baja alergenicidad cuando se inicie la alimentación con sólidos, mientras la AAP recomienda pautas concretas para la introducción de alimentos alergénicos:

Leche de vaca.....	12 meses
Huevo.....	24 meses
Cacahuete, nueces y pescado.....	3 años

3.4.- Pautas de tratamiento de la alergia alimentaria

Tanto la AAP como la ESPACI y la ESPGHAN coinciden en líneas generales en las recomendaciones para el tratamiento de niños con alergia confirmada a un alimento. El alimento causante debe eliminarse de la dieta, y si el niño está siendo alimentado con leche materna, la madre deberá evitar ingerir el alimento en cuestión. La AAP recomienda en este último caso la eliminación de la dieta materna de todos aquellos alimentos que

habitualmente causan alergia en niños: leche de vaca, huevo, pescado, cacahuets y nueces.

Estos comités recomiendan el uso de fórmulas basadas en hidrolizados proteicos extensivos cuando la lactancia materna no es posible o resulta insuficiente. En este caso las fórmulas basadas en hidrolizados parciales deben evitarse, debido a que se han producido reacciones relativamente frecuentes a estos productos en niños alérgicos a las proteínas de la leche de vaca (Businco *et al.*, 1989).

A diferencia del grupo europeo, la AAP considera la utilización de fórmulas basadas en soja para niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca mediada por IgE, si no hay evidencias de alergia concomitante a la soja, especialmente en niños mayores de 6 meses.

Las fórmulas basadas en mezclas de aminoácidos pueden ser necesarias en caso de intolerancia a las fórmulas basadas en hidrolizados extensivos de proteínas lácteas o soja y en casos de alergia a múltiples alimentos.

La leche de otros animales como cabra y oveja no se recomienda debido al alto grado de homología de sus proteínas con los alergenos de la leche de vaca, y a que se han observado frecuentes reacciones a ellas en individuos alérgicos a las proteínas de la leche de vaca.

La introducción de nuevos alimentos en la dieta de sujetos alérgicos a algún alimento debe llevarse a cabo extremando las precauciones. La pauta de incorporación de alimentos recomendada por la AAP para la prevención del desarrollo de alergia alimentaria podría considerarse apropiada (Zeiger, 2003).

4.-Evaluación de las fórmulas infantiles para la prevención y tratamiento de la alergia a proteínas de leche de vaca.

Las fórmulas infantiles destinadas a la prevención o tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca deben estar diseñadas para tener un valor nutricional lo más semejante posible al de la leche humana y ser seguras en términos de alergenidad (Businco *et al.*, 1993; Chandra, 1998; Exl, 2001).

La principal diferencia entre las distintas fórmulas con este destino es la fuente proteica y la referencia la leche materna.

La Organización para los Alimentos de la OMS, la AAP y la ESPGHAN consideró que un recién nacido necesitaba ingerir 2.0 - 2.2 g de proteína por kilogramo de peso corporal y día durante los primeros cuatro meses de vida, descendiendo a partir de entonces su necesidad a 0.2 g por kilogramo de peso y día, en sus recomendaciones de 1985. Los niños prematuros requerían alrededor de 1 g más por kilogramo de peso y día que los nacidos a término. Recientemente los requerimientos en cuanto a ingesta de proteínas han sido revisados y el nivel seguro ha sido reducido a 1.77 g de proteína por kilogramo de peso corporal y día para el recién nacido (FAO, 2005). El equilibrio nitrogenado, además de por la ingesta proteica se ve afectado por otros factores, tales como la ingesta energética global o los niveles hormonales (Rassin, 2003).

4.1.- Metabolismo de aminoácidos en el lactante

La gran importancia del aporte de proteínas en la dieta reside fundamentalmente en que son fuente de aminoácidos. Los aminoácidos ingeridos pueden: ser incorporados a las proteínas tisulares; ser degradados en reacciones catabólicas que resultan en la eliminación del nitrógeno como urea y el depósito del esqueleto carbonado como glucógeno o grasa o su combustión hasta CO₂; o ser utilizados como componentes para la

síntesis de otros compuestos nitrogenados, como las bases púricas, la creatina y la epinefrina (Crim y Munro, 1994).

En el cuerpo de un individuo adulto se sintetizan diariamente de 250 a 300g de proteína, aproximadamente 100g proceden de la ingesta, en el organismo se produce una reutilización extensiva de los aminoácidos a la que contribuyen sobre todo intestino, músculo, proteínas plasmáticas, leucocitos y hemoglobina.

La digestión de las proteínas empieza con la hidrólisis de los enlaces peptídicos próximos a leucina u otros aminoácidos aromáticos por la pepsina del jugo gástrico. La presencia de proteínas en el contenido intestinal estimula la secreción de proenzimas pancreáticas, estas se activan por la hidrólisis parcial de sus cadenas peptídicas, la tripsina hidroliza enlaces peptídicos adyacentes a lisina o arginina, la quimotripsina enlaces adyacentes a aminoácidos aromáticos y la elastasa a aminoácidos neutros alifáticos. Las exopeptidasas, carboxipeptidasas y aminopeptidasas, actúan sobre los extremos carboxilo y amino libres respectivamente.

Los aminoácidos libres son absorbidos por las células de la mucosa intestinal a través de transportadores dependientes de energía con cierta especificidad por aminoácidos básicos, ácidos y neutros. Los péptidos pequeños son degradados a aminoácidos por acción de las hidrolasas del borde en cepillo y del citoplasma de las células de la mucosa (Crim y Munro, 1994).

Los aminoácidos en el enterocito pueden ser utilizados para la síntesis de proteínas de la mucosa, síntesis de aminoácidos no esenciales, aporte energético o pueden ser liberados al torrente sanguíneo (Sánchez de Medina, 2005). En humanos sanos la digestibilidad en el ileon del nitrógeno proteico de la dieta varía dependiendo del tipo de proteína, la composición de la dieta y variaciones en la tasa de vaciamiento gástrico y tránsito intestinal. El nitrógeno que llega al colon procede de la dieta (no absorbido por el intestino), endógeno (secreciones y descamaciones) y del hígado en forma de urea. La mucosa intestinal absorbe aminoácidos endógenos y de la dieta, metaboliza una porción y

vierte otra a la vena porta. La actividad metabólica del tejido intestinal es alta, en la mucosa tiene lugar el 10% de la síntesis de proteínas y el catabolismo de aminoácidos esenciales y no esenciales (Mariotti, 2000). Las células de la mucosa intestinal metabolizan parte de los aminoácidos que entran en ellas, el ácido glutámico y la glutamina se transforman en alanina (ver figura 2). La glutamina es esencial para las funciones epiteliales y la integridad de la mucosa tanto en estado normal como patológico. El ácido glutámico, la glutamina y el ácido aspártico proporcionan energía, la ornitina participa en la síntesis de poliaminas, la arginina en la síntesis de óxido nítrico y el ácido glutámico, la glicina y la cisteína en la formación de glutatión.

El intestino ejerce un papel modulador y tamponador en los estados post-absortivo y postprandial con respecto a la llegada de aminoácidos a los tejidos periféricos. El intestino es el primer paso que afecta al metabolismo y la eficiencia de utilización del nitrógeno. La cinética de absorción puede variar y modificar el destino del nitrógeno absorbido. Las proteínas del suero lácteo y la caseína exhiben diferente comportamiento digestivo y absorptivo e inducen diferentes perfiles de aminoácidos en estado postprandial. La calidad de la proteína de la dieta puede influir en el primer paso de extracción de aminoácidos en el intestino incrementando su retención temporal. La adición de carbohidratos a la dieta aumenta la extracción intestinal de aminoácidos, reduce la entrada en hígado y la producción de urea, porque retrasan el vaciamiento gástrico, modificando la cinética de absorción y estimulando la producción de insulina.

El intestino es cuantitativamente importante aportando aminoácidos cuando los tejidos periféricos lo requieren y reacciona rápidamente a cambios metabólicos por su sensibilidad nutricional y hormonal, su gran masa y la reutilización continua de aminoácidos. Controlando el vertido de los mismos al flujo portal el intestino ejerce una influencia considerable sobre el metabolismo hepático (Mariotti, 2000).

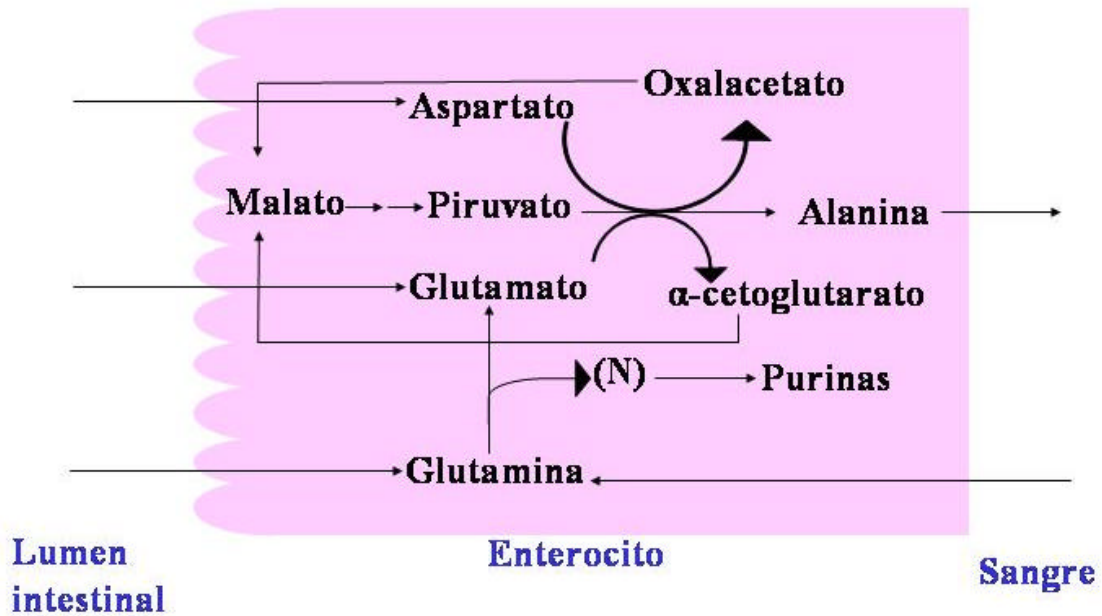


Figura 2: Metabolismo de aminoácidos en el enterocito (Sánchez de Medina, 2005).

Los aminoácidos llegan al hígado a través de la vena porta y pueden pasar a la circulación sin ser metabolizados; utilizarse en la síntesis de péptidos, proteínas, purinas y pirimidinas; catabolizarse para producir energía (cuando el aporte proteico de la dieta es alto) o participar en la gluconeogénesis (Sánchez de Medina, 2005).

En el hígado tiene lugar el catabolismo de aminoácidos esenciales (Arg, His, Lys, Met, Phe, Thr, Trp) y no esenciales (Ala, Pro, Oh-Pro, Ser, Gly, Asp) generando ácido glutámico y amoniaco, que originan urea que es excretada en la orina (ver figura 3).

El hígado controla la absorción y metabolismo de estos aminoácidos según las necesidades corporales. Utiliza una porción para la síntesis de proteínas hepáticas, secreta proteínas plasmáticas y aproximadamente un cuarto de los aminoácidos que se absorben pasa a la circulación general.

Cuando la ingesta de un aminoácido supera los requerimientos del organismo el hígado induce un incremento en la actividad de las enzimas degradativas de ese aminoácido, en los aminoácidos esenciales el incremento es repentino mientras que para los no esenciales el incremento es progresivo. Tras la ingesta de proteínas se estimula la síntesis de las enzimas implicadas en el metabolismo de los aminoácidos, dichas enzimas son además estabilizadas por su interacción con el sustrato por lo que su degradación se reduce. A pesar del control del hígado los aminoácidos pueden aparecer en los tejidos periféricos en mayor cantidad de lo necesario para la síntesis proteica u otros propósitos (Crim y Munro, 1994).

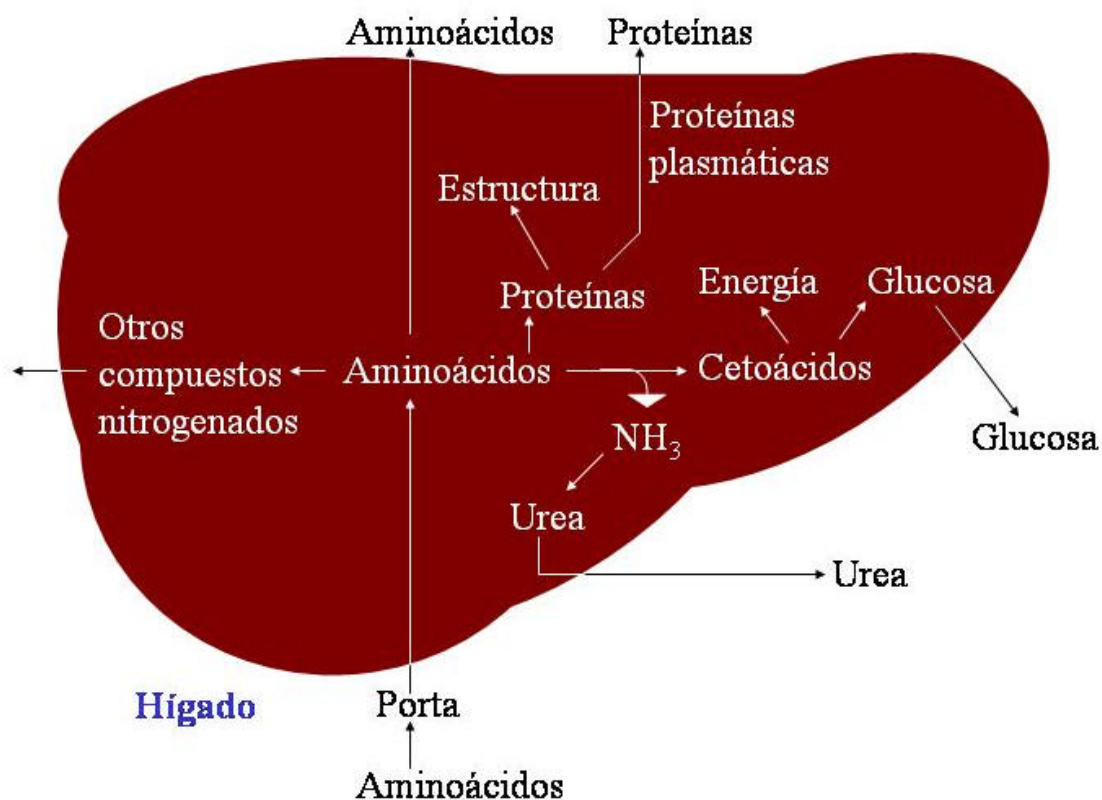


Figura 3: Metabolismo de aminoácidos en el hígado (Sánchez de Medina, 2005).

En el músculo (40-45% de la masa corporal) la insulina tras la ingesta estimula la captación de aminoácidos y la síntesis proteica; durante el ayuno los glucocorticoides tienen efectos opuestos, los aminoácidos son liberados para la gluconeogénesis (Sánchez de Medina, 2005). El músculo esquelético es el principal lugar de metabolismo para los aminoácidos ramificados (Leu, Ile y Val) que constituyen del 15 al 20% de los aminoácidos de las proteínas (ver figura 4).

La degradación de las proteínas en músculo se produce por 4 vías: proteasas lisosomales acidicas(catepsinas), proteasas activadas por calcio (calpinas), vía citosolica independiente de ATP y via citosolica dependiente de ATP. En músculo esquelético la mayoría de las proteínas se degradan por un proceso que requiere ATP, ubiquitina y el proteosoma; los péptidos son degradados a aminoácidos por las peptidasas citosólicas. En adultos normales el balance de nitrógeno se mantiene principalmente por las respuestas anabólicas postprandiales: incremento de la síntesis proteica y descenso de la degradación proteica. Tras la ingesta la oxidación de aminoácidos de cadena ramificada aumenta. Una reducción de la proteína en la dieta conlleva un descenso en la oxidación de aminoácidos, incrementando así su disponibilidad para la síntesis de proteínas, cuando el nivel cae por debajo de los requerimientos diarios, la oxidación no puede disminuir más y el individuo entra en riesgo de malnutrición (Newby, 1998).

En el sistema nervioso el ácido glutámico es el aminoácido más captado, el y sus metabolitos γ -aminobutrico y glutamina actúan como neurotransmisores. La formación de glutamina permite la eliminación del amoniaco que se forma en las células nerviosas. En el tejido nervioso los aminoácidos aromáticos y ramificados comparten el sistema de transporte, en caso de insuficiencia hepática aumentan los aminoácidos aromáticos y sus metabolitos pudiendo llegar a causar encefalopatías (Sánchez de Medina, 2005).

La entrada o salida neta de aminoácidos de un órgano esta determinada por el gradiente de acción masas de sustratos a través de la membrana celular, la actividad de los sistemas transportadores de aminoácidos y las concentraciones de aminoácidos

compitiendo por el mismo transportador. El patrón de intercambio de aminoácidos interorganos cambia en distintas condiciones fisiológicas (Tessari, 2000).

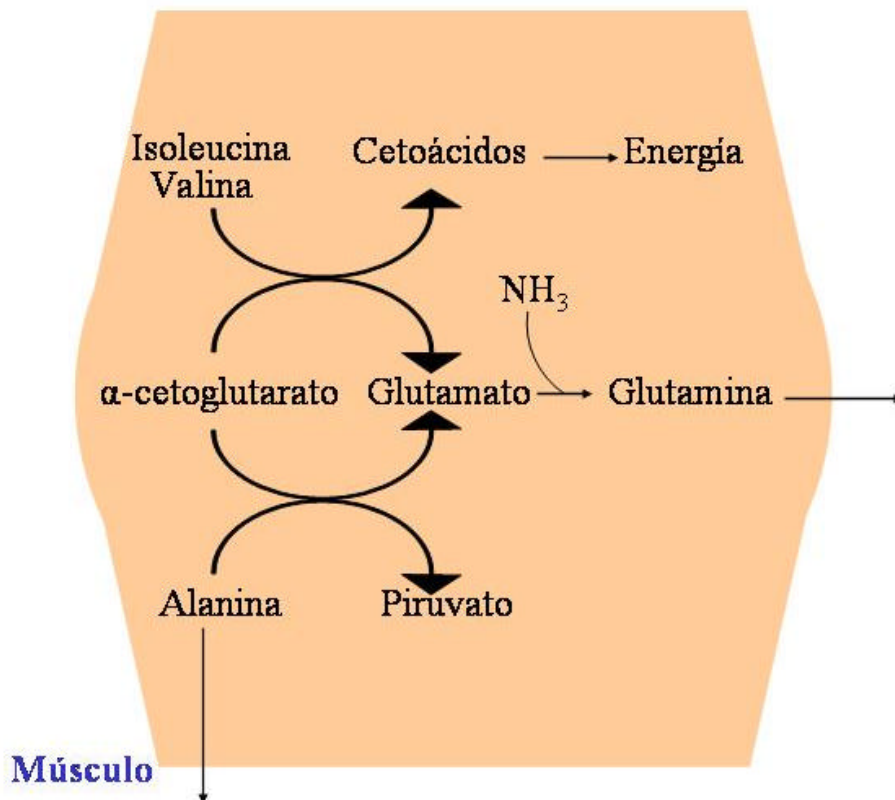


Figura 4: Metabolismo de aminoácidos en músculo (Sánchez de Medina, 2005).

La mucosa intestinal responde a un influjo de glutamina y ácido glutámico de la dieta u órganos periféricos y por transaminación de ácido piruvico forma alanina. La alanina llega al hígado a través de la vena porta., donde el esqueleto carbonado entra en la gluconeogenesis y la parte nitrogenada se convierte en urea. Las tasas de catabolismo de los aminoácidos esenciales en el hígado están reguladas según las necesidades corporales. Los aminoácidos ramificados son catabolizados principalmente en los tejidos periféricos: músculo, tejido adiposo y riñón. La glutamina es el principal vehículo para transportar nitrógeno del músculo al hígado, es también la fuente de nitrógeno para la síntesis de amoniaco por el riñón. El intercambio entre hígado, músculo y tejido adiposo de hidratos de carbono y metabolitos grasos esta regulado por la insulina y el glucagon (Crim y Munro, 1994).

El amoníaco generado por la desaminación es transformado en urea y eliminado por la orina, aunque las células hepáticas pueden utilizarlo para la síntesis de aminoácidos no esenciales por la acción de la glutamato deshidrogenasa, también puede ser empleado para generar glutamina a partir de glutamato, este es el mecanismo de captación de amoníaco en los tejidos periféricos, la glutamina es el aminoácido más abundante en plasma sanguíneo. El músculo, el tejido adiposo, los pulmones y el cerebro sintetizan glutamina que vierten a la sangre. Las reacciones que dan lugar a la urea se producen en el hígado (ver figura 5), en la mucosa intestinal se producen las etapas que llegan a la producción de ornitina, prolina, citrulina y arginina (Sánchez de Medina, 2005).

Los productos finales del metabolismo del nitrógeno se excretan en orina, mayoritariamente como urea, amoníaco, ácido úrico y creatinina, la proteína no absorbida de la dieta y la secretada al lumen no reabsorbida se pierde en heces. También se pierde nitrógeno por descamaciones, secreciones etc. Cuando la dieta tiene un contenido normal en proteína el 80% del nitrógeno urinario está en forma de urea. Durante el ayuno la cantidad absoluta de nitrógeno en forma de amoníaco crece en orina en respuesta a la acidosis. La excreción de creatinina tiende a ser independiente de la proteína de la dieta o de la ingesta calórica porque es producto del pool de creatina en músculo, y este no se altera rápidamente con cambios en la dieta.

El balance de nitrógeno se hace más negativo cuando la ingesta energética esta por debajo de las necesidades corporales y se hace más favorable cuando esta supera los requerimientos del individuo, siempre que la cantidad de proteína de la dieta no sea limitante. Las hormonas del crecimiento y testosterona (anabólicas) y corticosteroides y tiroxina (catabólicas) tienen un efecto pronunciado en el metabolismo proteico muscular. La proteína de la dieta también afecta al balance nitrogenado. Cuando la ingesta es baja el balance mejora proporcionalmente a la proteína añadida en la dieta, cuando se incrementa mucho, la eficiencia desciende, es importante la calidad de la proteína.

El procesamiento de los alimentos puede causar que los aminoácidos no estén disponibles por reaccionar con azúcares o lípidos por tratamientos térmicos, básicos o condiciones de oxidación. Cantidades desproporcionadas de aminoácidos pueden producir efectos de toxicidad, antagonismo y desequilibrio (Crim y Munro, 1994).

El perfil de aminoácidos en plasma es el resultado de la interacción entre los tejidos, la captación y la liberación de aminoácidos por los mismos. La concentración en plasma (2 mM) es 10 veces menor que la de los tejidos y su distribución es muy constante, aunque puede afectarse por la elevada ingesta de hidratos de carbono, que aumenta la captación de aminoácidos en músculo (Sánchez de Medina, 2005), a través de un transporte mediado por insulina. Este efecto es máximo en aminoácidos de cadena ramificada, mientras que afecta mínimamente a otros como el triptófano. Las alteraciones en la concentración plasmática de aminoácidos afectan a la disponibilidad de los mismos para los tejidos periféricos (Crim y Munro, 1994).

El metabolismo de los aminoácidos tiene lugar a través de reacciones de transaminación, desaminación, aminación, amidación, desamidación y descarboxilación.

Los aminoácidos se utilizan en el hígado como fuente energética cuando están en exceso, en el músculo los aminoácidos ramificados son utilizados para obtener energía especialmente durante el ayuno, los enterocitos utilizan como fuente energética sobre todo la glutamina, este aminoácido también es usado con el mismo fin por las células del sistema inmunológico. La degradación de los aminoácidos a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs produce un poco menos de energía que la de los hidratos de carbono.

Los aminoácidos se usan para generar glucosa cuando la dieta es pobre en hidratos de carbono, en ayuno, estrés metabólico y diabetes.

Se denominan aminoácidos gluconeogénicos aquellos que dan lugar a:

Piruvato: Gly, Ala, Cys, Ser, Thr, Trp

α -Cetoglutarato: Glu, Gln, Arg, His, Pro

Oxalacetato: Asp, Asn

Se denominan cetogénicos los que dan lugar a:

Acetil-coenzima A: Leu, Thr, Ile, Lys, Phe, Tyr, Trp (Sánchez de Medina, 2005).

Las proteínas constituyen de un 10-12% de la ingesta de la energía y proporcionan los aminoácidos para la síntesis de proteínas. Los requerimientos nutricionales para el lactante van disminuyendo desde 1985 se ha considerado segura la ingesta de 2.2 g/Kg/día de 1 a 3 meses; 1.6 g/Kg/día de 4 a 6 meses; 1 g/Kg/día de 9 a 12 meses (Maldonado-Lozano y Gil Campos, 2005). Recientemente se han revisado y reducido los requerimientos proteicos como se mencionó al principio de este apartado pasando a ser: 1.77 g/Kg/día el primer mes para ir disminuyendo progresivamente hasta 1.31 g/Kg/día en el sexto mes y 1.14 g/Kg/día al año, el mismo informe de la FAO (2005) recoge los requerimientos en de aminoácidos nutricionalmente importantes hasta el sexto mes, ver tabla .

Tabla 2: Requerimientos de aminoácidos en lactantes (hasta los 6 meses) en mg/g de proteína según informe de la FAO 2005.

Aminoácido	Lisina	Aminoácidos azufrados	Treonina	Triptófano
Requerimientos	57	28	31	8.5

La alta eficiencia de deposición proteica del recién nacido esta asociada con una elevada estimulación de la síntesis proteica en los tejidos en respuesta a la ingesta. Esta respuesta desciende conforme el individuo se desarrolla y se hace mayor.

Potenciales mediadores de la estimulación de la síntesis proteica por la ingesta son: IGF-I (insulin-like growth factor-I), hormona del crecimiento, glucagon e insulina.

Sólo la insulina aumenta rápidamente en respuesta a la ingesta y estimula la síntesis proteica en músculo esquelético de ratas destetadas, pero todavía en crecimiento. La

insulina media la estimulación de la síntesis de proteína en músculo esquelético durante la vida postnatal temprana, esa respuesta desciende durante el desarrollo, la insulina no estimula la síntesis de proteínas hepáticas. La acción de la insulina no varía al usar distintas fuentes de aminoácidos, tampoco se ha observado que sea limitante una reducción del nivel de aminoácidos no esenciales circulantes. Un aumento en la concentración de aminoácidos circulantes produce un marcado incremento en la síntesis de proteínas en hígado, mientras que apenas afecta a la síntesis en músculo esquelético. La estimulación de la síntesis de proteínas en músculo por la ingesta está mediada por un incremento de la secreción de insulina y un aumento de la sensibilidad del músculo a la insulina mediada por leucina. Esta sensibilidad es alta durante la lactancia pero desciende durante el destete, y no existe en el adulto. En adultos el incremento de proteína muscular durante la ingesta es debido más a un descenso de la degradación proteica que a un incremento de la síntesis. En resumen, en el recién nacido la ingesta provoca un aumento de la síntesis de proteínas en hígado mediada por aminoácidos y en músculo por la acción de la insulina (Davis *et al.*, 1998).

La pérdida de proteína en enfermedad puede ser apreciable, cada enfermedad afecta de modo distinto a las necesidades proteicas y existe gran variación interindividual. El soporte nutricional por sí solo es insuficiente para prevenir la pérdida de proteína, principalmente de músculo esquelético, asociada con infección, inflamación, trauma quirúrgico, SIDA..., la insulina, IGF-I o la hormona del crecimiento quizás podrían aumentar el efecto de la terapia nutricional (Davis *et al.*, 1998).

En la nutrición enteral la arginina suplementada a prematuros de menos de 32 semanas de edad gestacional redujo el número de episodios de enterocolitis necrotizante. La suplementación de glutamina en prematuros ha mostrado una reducción de la incidencia de sepsis y mejoría en la tolerancia de la alimentación oral; no ha mostrado beneficios en niños con síndrome de Crohn, quemados y pacientes críticos, en niños sometidos a quimioterapia ha mostrado una disminución en la incidencia y severidad de la mucositis (Moreno-Villares y Pedrón-Giner, 2005). En nutrición parenteral se administran L-

aminoácidos en solución, las necesidades de estos niños son superiores; hasta los 6 meses son semiesenciales: cisteína, tirosina, histidina, arginina y glicina; también son importantes la glutamina y taurina. El aporte deberá variar en función del grado de estrés (Moran-Penco *et al.*, 2005).

En uremia, la pérdida de nitrógeno urinario desciende con una dieta baja en proteínas pero el catabolismo proteico muscular aumenta. La acidosis puede ser un estímulo proteolítico.

En síndrome nefrótico, se compensan las pérdidas urinarias suprimiendo la oxidación de aminoácidos y la excreción de urea.

En otras condiciones como cáncer, sepsis, quemaduras... se incrementa la degradación de aminoácidos de cadena ramificada.

La degradación proteica es estimulada por acidosis metabólica, glucocorticoides en estados patológicos e insulinopenia.

La síntesis y degradación de proteínas y la oxidación de aminoácidos están integradas para preservar la masa corporal normal. En varios estados patológicos se produce pérdida de masa muscular por un aumento de actividad de la vía ubiquitina-proteosoma y la a-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (Newby, 1998).

Las recomendaciones descritas previamente para la ingesta proteica asumen que las proteínas suministradas contienen en cantidad suficiente todos los aminoácidos considerados esenciales, esto es, aquellos que deben ingerirse con la dieta por ser indispensables para el organismo y no ser éste capaz de sintetizarlos.

Los requerimientos de aminoácidos esenciales también van disminuyendo con la edad. En porcentaje del total de aminoácidos requeridos: 43% en lactantes, 36% en niños y 19% en adultos. Los aminoácidos esenciales en el hombre son: leucina, valina, isoleucina, fenilalanina, metionina, lisina, treonina y triptofano; histidina hasta los 6 meses y cisteína en el recién nacido, que además necesita un aporte diario de 65 $\mu\text{mol/l}$ de L-carnitina (Maldonado-Lozano y Gil Campos, 2005).

Glicina y serina se consideran semiesenciales porque su esqueleto carbonado puede ser sintetizado pero no aminado. Los aminoácidos no esenciales son sintetizados a partir de cetoácidos por aminación y transaminación.

Otros aminoácidos pueden ser requeridos en circunstancias especiales: Cuando no pueden ser sintetizados por un defecto metabólico hereditario, como la tirosina en individuos fenilcetonúricos o la cisteína en caso de homocistinuria. En caso de enfermedad, como los aminoácidos ramificados en la disfunción hepática. En condiciones nutricionales especiales, como la arginina durante la nutrición parenteral total. Durante el desarrollo, como la cisteína en el niño prematuro (Rassin, 2003).

Algunos aminoácidos no esenciales son excluidos de la alimentación del recién nacido en situaciones especiales por su potencial toxicidad. En las soluciones para la nutrición parenteral usualmente se excluye el ácido glutámico por ser potencialmente neurotóxico (Rassin, 2003). Un exceso de determinados aminoácidos puede ser tan perjudicial para el desarrollo como una deficiencia de los mismos; la metionina y la tirosina están entre los más tóxicos (Crim y Munro, 1994).

Una característica importante del crecimiento del recién nacido es la marcada diferencia entre la tasa de crecimiento de los distintos tejidos, siendo el crecimiento intestinal particularmente rápido. En animales en crecimiento los requerimientos relativos de aminoácidos para soportar dicho crecimiento y mantener el equilibrio del nitrógeno parecen ser marcadamente diferentes. No parece que exista una relación sistemática entre la tasa de crecimiento de los neonatos de especies dadas y la composición de aminoácidos de la mezcla de proteínas que reciben en la leche, exceptuando los esenciales (Reeds, 2000).

La cisteína y la histidina se identificaron como esenciales para el desarrollo, pero no así la arginina cuando se evaluaron el crecimiento, la retención de nitrógeno y las proteínas plasmáticas en niños alimentados con fórmulas deficientes en uno solo de estos aminoácidos (Rassin, 2003). La treonina parece ser también limitante para el lactante

(Reeds, 2000); en grandes cantidades causa sólo una reducción moderada de la tasa de crecimiento (Crim y Munro, 1994).

La mezcla de aminoácidos proporcionada por la leche humana es en algunos aspectos desequilibrada. El 20% de la concentración de aminoácidos está compuesta por ácido glutámico y glutamina; sumando a estos la cantidad de prolina y leucina constituyen el 40% del total de aminoácidos, siendo notable la deficiencia en arginina, alanina y glicina. El lactante debe llevar a cabo la transformación de los aminoácidos que recibe en exceso en aquellos que no le son proporcionados en cantidad suficiente (Rassin, 2003).

La elevada concentración de glutámico y glutamina de la leche puede ser la que soporta el metabolismo de la mucosa intestinal. Leucina e isoleucina son también importantes donadores de nitrógeno para glutámico y glutamina, y se encuentran en exceso en la leche. A partir del glutámico de la dieta, la mucosa sintetiza alanina, citrulina y arginina. La glicina, otro aminoácido aportado en poca cantidad por la leche, actúa como precursor para la síntesis de bases púricas, de creatina, es componente de GSH (en relación con la defensa peroxidativa y la integridad celular), y es también fuente de nitrógeno para el grupo hemo, por lo que aunque no se conoce el mecanismo, la síntesis de glicina en el recién nacido debe ser muy alta (Reeds, 2000).

En el recién nacido hay varias rutas metabólicas en las que participan aminoácidos que tienen un impacto importante en el desarrollo del mismo, debido fundamentalmente a que la actividad de muchas de las enzimas participantes en el metabolismo de los aminoácidos tienen una tasa de actividad inferior a la del adulto. Cabe destacar la ruta que implica a los aminoácidos aromáticos, la que implica a los azufrados y el ciclo de la urea (Rassin, 2003).

La fenilalanina es transformada en tirosina por la fenilalaninahidroxilasa. Esta enzima hepática tiene en el hígado fetal un 59% de la actividad que en el adulto. La tirosina se transforma en ácido p-hidroxifenilpiruvico por la actuación de la tirosinaminotransferasa, cuya actividad en el feto es un 7% de la del adulto. El ácido p-hidroxifenilpiruvico tras

una serie de reacciones de oxidación es degradado, teniendo esta ruta de oxidación en el feto, sólo un 8% de la actividad del adulto. Así, el recién nacido es menos capaz de sintetizar tirosina que el adulto, pero su limitación es aún mayor para catabolizar este aminoácido (Rassin *et al.*, 1977). Esta es probablemente la causa de los casos de tirosinemia transitoria descritos en neonatos. Dicha tirosinemia esta originada por una alta concentración de aminoácidos aromáticos en la dieta, particularmente en la caseína de la leche de vaca (Järvenpaa *et al.*, 1982).

En relación con los aminoácidos azufrados, Snyderman *et al.*, 1963 mostraron que la ausencia en la dieta de cisteína provoca un retraso en el crecimiento. La cistationasa, la enzima que cataliza la síntesis de cisteína a partir de cistationina no presenta actividad en el hígado fetal, principal lugar de síntesis de cisteína, aunque si en otros tejidos. Otras enzimas de la ruta metabólica de la metionina, como la cistationina- β -sintasa y la metioninadenosiltransferasa, tienen también reducida su actividad en el hígado del feto con respecto al adulto; la primera muestra un 1.5% de la actividad mostrada en el adulto y la segunda un 30%. Parece que el feto en un principio remetila la metionina, mientras que en la vida neonatal temprana comienza a sintetizar cisteína y taurina a partir de homocisteína, vía cistationina, por lo que el niño prematuro requeriría cisteína para la síntesis proteica (Rassin, 2003).

La taurina no es bien sintetizada por el ser humano en ningún estadio del desarrollo. En el hígado del feto, la actividad de la cisteinacidosulfínicodecarboxilasa, que cataliza la transformación de hipotaurina en taurina, es un 81% de la del adulto. Este aminoácido esta presente en la mayoría de los tejidos animales y en la dieta de la mayoría de los seres humanos. Aunque no es un constituyente de las proteínas tiene funciones muy importantes en el recién nacido, como se ha comentado en el apartado de inmunidad y nutrición. Desde 1980 se ha venido adicionando a las fórmulas infantiles ya que se observó que los niños alimentados con fórmula tenían concentraciones plasmáticas de taurina muy inferiores a las de los niños alimentados al pecho (Rassin, 2003).

El ciclo de la urea representa un proceso metabólico crítico para la eliminación del nitrógeno de deshecho resultado del catabolismo proteico. Las enzimas del ciclo de la urea están presentes en el hígado del feto, aunque no es completamente activo, como muestra el hecho de que niños prematuros alimentados con nutrición total parenteral libre de arginina desarrollan hiperamonemia, aunque ésta no se refleja en cambios en el equilibrio nitrogenado o el crecimiento (Snyderman *et al.*, 1959). La suplementación con arginina parece compensar exitosamente este bloqueo metabólico, la suplementación de citrulina tiene un efecto limitado y la ornitina no tiene ningún efecto (Czarncki *et al.*, 1984). No obstante, el exceso de arginina se ha asociado con efectos de toxicidad en el páncreas (Mizunuma *et al.*, 1984).

En el hígado del feto la ornitina transcarbamilasa, la arginosuccinasa, la arginasa y la arginosuccinatoliasa muestran un 31%, 17%, 46% y 2%, respectivamente, de la actividad que presentan en el adulto (Räihä, 1968; Räihä, 1986).

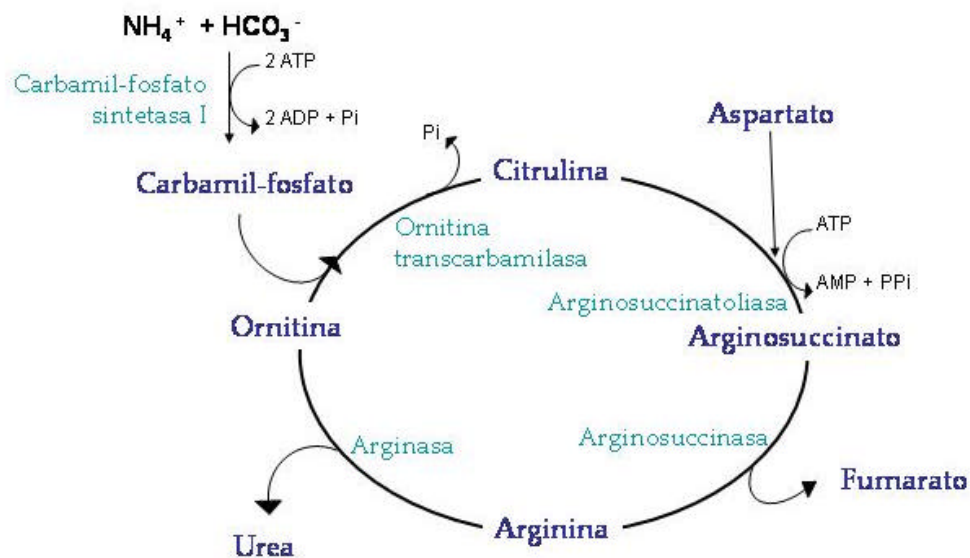


Figura 5: Ciclo de la urea.

4.2.- Evaluación nutricional

Las dos fuentes proteicas más frecuentemente utilizadas en las fórmulas infantiles comerciales son la caseína y la proteína sérica de leche de vaca. Estas proteínas tienen un contenido en la mayoría de aminoácidos similar al de la leche humana con varias excepciones importantes.

Las concentraciones de treonina y metionina están particularmente elevadas y las de triptófano, cisteína y taurina especialmente disminuidas en las fórmulas basadas predominantemente en proteína sérica. Las fórmulas basadas en caseína tienen también un contenido reducido de triptófano, cisterna y taurina. Cuando se tiene en cuenta la ingesta real al comparar las fórmulas con la leche materna, la mayoría de los aminoácidos son aportados en exceso considerable, a excepción de la cisteína en las fórmulas basadas en caseína, aunque en el recién nacido se mantiene la concentración plasmática de este aminoácido.

Este aporte excesivo de aminoácidos se refleja en un incremento de la concentración plasmática de los mismos. Así, es muy notable el incremento de treonina en plasma en los niños alimentados con fórmulas basadas en proteína sérica, mientras que en los alimentados con las basadas en caseína se produce un aumento de fenilalanina y tirosina, esta última de manera importante en niños prematuros (Rassin, 2003).

Algunos estudios indican que los niños alimentados con fórmulas infantiles pueden presentar concentraciones plasmáticas reducidas de triptófano, incluso cuando en la fórmula parece estar en cantidad suficiente. La manipulación en la fórmula de las proporciones de caseína y proteína sérica no llega a corregir estos defectos (Janas *et al.*, 1987).

Hernell y Lonnerdal, evaluaron en un estudio relativamente reciente, 2003, la adecuación nutricional de fórmulas infantiles basadas en hidrolizados de proteínas de leche de vaca, caseína y proteína sérica en niños sanos nacidos a término a través de los

aminoácidos plasmáticos, análisis hematológico y elementos traza. Las fórmulas fueron bien toleradas y resultaron en un crecimiento sano y satisfactorio, aunque el estudio no estaba diseñado para medir crecimiento. La concentración obtenida de nitrógeno en forma de urea fue significativamente superior en el grupo que recibió hidrolizado de caseína, debido a una mayor concentración de proteínas en esta fórmula y como resultado del catabolismo hepático del exceso de aminoácidos.

En un estudio en niños con historia familiar de atopia alimentados parcialmente con leche materna y con fórmula basada en hidrolizado de caseína, éstos mostraron un menor índice de masa corporal que los alimentados exclusivamente con leche materna sin diferencias significativas en los índices antropométricos a los 3 meses de edad. También en este estudio, la concentración de nitrógeno en forma de urea fue mayor en el grupo alimentado con hidrolizado de caseína (Giovannini *et al.*, 1994).

En un estudio en el que los aportes de proteína fueron similares entre el grupo alimentado con formula convencional (predominantemente de proteína sérica) y el alimentado con hidrolizado de proteína sérica, también aparecieron mayores concentraciones de nitrógeno en forma de urea en los alimentados con hidrolizado (Vandenplas *et al.*, 1993), lo que refuerza la hipótesis ya apuntada por otros estudios de que la utilización de los aminoácidos por el organismo puede ser diferente cuando estos proceden de hidrolizados (Smith, 1982; Decsi *et al.*, 1996).

Otro factor a tener en cuenta es el procesamiento de los alimentos, el cual puede alterar la biodisponibilidad de los aminoácidos. El tratamiento térmico suave en presencia de azúcares reductores produce pérdidas de lisina biológicamente disponible (reacciones de Maillard). En condiciones de calentamiento severo, en presencia o incluso en ausencia de azúcares o lípidos oxidados, las proteínas alimentarias pueden hacerse resistentes a la digestión. Bajo condiciones de alta alcalinidad, los residuos de lisina y cisteína pueden reaccionar y formar lisinoalanina, que puede ser tóxica. Asimismo, en condiciones de oxidación, se produce una pérdida de metionina (Crim y Munro, 1994).

En otro estudio, niños sanos alimentados con una fórmula mezcla de hidrolizados de proteína sérica y caseína en proporciones 60:40, durante los dos primeros meses de vida, mostraron ganancia en peso y crecimiento en longitud similares a los de niños alimentados con una fórmula infantil convencional basada en leche de vaca (Decsi *et al.*, 1996).

Otros investigadores, sin embargo encontraron que durante el primer mes de vida niños alimentados con fórmulas de hidrolizados de proteínas de soja, hidrolizados de proteína sérica y caseína combinados e hidrolizado de proteína sérica crecieron más lentamente que niños alimentados con una fórmula convencional. Asimismo, encontraron diferencias entre marcas comerciales causadas porque la composición en ácidos grasos también difería entre dichas fórmulas (Rigo *et al.*, 1994(a)).

El estado de madurez del intestino parece afectar a las consecuencias de la introducción de fórmulas en la nutrición infantil, por lo que es muy importante la edad a la que esto tenga lugar (Hernell y Lonnerdal, 2003).

Las concentraciones plasmáticas de aminoácidos en niños alimentados con hidrolizados de proteínas de leche de vaca difieren, para algunos aminoácidos, de las observadas en niños alimentados con leche materna.

El triptófano (Trp) se encuentra en menor concentración en los niños alimentados con fórmulas. Este aminoácido está implicado en el metabolismo de neurotransmisores (serotonina) y las diferencias en patrones de sueño entre los niños alimentado al pecho y los alimentados con fórmula pueden explicarse por las diferencias en Trp circulante (Räihä, 1986; Janas *et al.*, 1987). Se ha sugerido que las altas concentraciones de aminoácidos ramificados observadas en niños alimentados con fórmula con alto contenido proteico pueden afectar al metabolismo de la insulina, y por tanto, al metabolismo de los hidratos de carbono, la ganancia en peso y eventual e hipotéticamente al desarrollo de diabetes (Järvenpää *et al.* 1982; Lonnerdal y Chen, 1990). Aunque no hay evidencia de tales efectos, parece prudente ajustar las concentraciones de Trp y

aminoácidos ramificados en fórmulas hidrolizadas para que los niveles en plasma sean similares a los alcanzados en los niños alimentados al pecho.

Las mayores concentraciones de Trp, Thr y Arg encontradas en plasma de niños alimentados con fórmulas basadas en proteína sérica con respecto a los alimentados con hidrolizados de caseína pueden ser reflejo de la mayor proporción de estos aminoácidos en la proteína de partida (Hernell y Lonnerdal, 2003).

La elevada concentración de Pro en grupos alimentados con fórmulas de hidrolizados de caseína puede ser reflejo de la mayor proporción de este aminoácido en la proteína y de la mayor concentración de proteína total (Hernell y Lonnerdal, 2003).

Hernell y Lonnerdal (2003) no encontraron diferencias significativas en su estudio en Cu y Zn en plasma entre los grupos alimentados con las distintas fórmulas, ni entre estos y los alimentados al pecho.

En un estudio comparativo entre niños alimentados con formula hidrolizada de proteína sérica y niños que recibieron una formula convencional predominantemente basada en proteína sérica, con cantidades similares de proteína, se observaron diferencias en los perfiles de aminoácidos plasmáticos no explicables por la diferencia de la composición de aminoácidos de las fórmulas (Hauser *et al.*, 1997). No se conoce si las diferencias son debidas a diferentes tasas de absorción de aminoácidos o péptidos o a efectos distintos en el metabolismo de aminoácidos.

Considerando estas diferencias inherentes en la composición de aminoácidos entre proteína sérica y caseína y la respuesta de los aminoácidos plasmáticos, parece que una combinación entre los dos tipos de hidrolizados podría resultar en un aminograma fisiológicamente más normal, más parecido al de los niños alimentados al pecho. La adición de aminoácidos libres a las fórmulas trata de ser evitada ya que proporcionan sabores desagradables.

Finalmente es importante recordar que los productos basados en hidrolizados lácteos se han empleado en Europa durante años, sin que se hayan encontrado diferencias significativas en ganancia en peso, incremento de estatura o crecimiento de la circunferencia craneal entre los niños alimentados con ellos y aquellos nutridos con otras fórmulas o leche materna (Giovannini *et al.*, 1994; Rigo *et al.*, 1994(a); Exl *et al.*, 1998).

La evaluación de la calidad de las proteínas se realiza previamente en bioensayos con animales de experimentación. De este modo los estudios en animales orientarán sobre la idoneidad de las potenciales nuevas fuentes proteicas a la hora de ser evaluadas en humanos (Hurt *et al.*, 1975; Boza *et al.*, 1994).

Los estudios de evaluación de la calidad proteica se realizan usualmente en ratas en crecimiento. A través del balance de nitrógeno se determinan la digestibilidad de la proteína, la utilización neta proteica, el valor biológico de la proteína y el coeficiente de eficacia en crecimiento (Harris *et al.*, 1988). Para la obtención de estos parámetros de calidad de la proteína, los animales son alimentados con dietas que únicamente difieren en el tipo de fuente proteica, durante un periodo variable de 10 a 14 días. A lo largo de este periodo se miden la ingesta proteica, el incremento de peso y el nitrógeno excretado en heces y orina. Las fuentes proteicas experimentales son siempre evaluadas frente a otra que es considerada como la referencia, y que suele estar compuesta de caseína con una adición del 5% de metionina (Boza *et al.*, 1994; de Regil y de la Barca, 2004).

El método PER (Protein Efficiency Ratio), método 960.48 de la AOAC, es considerado adecuado por la FDA (Food and Drug Administration) para la evaluación de la calidad de la proteína (Hurt *et al.*, 1975). En dicho método se evalúa el incremento de peso frente a la ingesta proteica, en grupos de 10 ratas macho durante 28 días, comparando los grupos alimentados con las fuentes proteicas objeto de estudio con una proteína establecida como referencia: Caseína ANRC de New Zealand Milk Products. (Method 960.48 AOAC; 2000)

4.3.- Evaluación de antigenicidad y alergenicidad

Las fórmulas hipoalérgicas, además de nutricionalmente adecuadas, deben ser seguras para los individuos atópicos. Según el "Nutritional Comitee of the American Academy of Paediatrics" para que una formula pueda considerarse hipoalérgica debe mostrar una tolerancia clínica del 90 % en niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca mediada por IgE, con un intervalo de confianza del 95 % (Businco *et al.*, 1993; ESPGAN, 1993; Host *et al.*, 1999]. Este tipo de estudios, además de un alto coste y considerable duración en el tiempo, conllevan riesgos para los sujetos incluidos en ellos, por lo que requieren la supervisión de profesionales experimentados. Todos estos factores han hecho necesario el desarrollo de otros métodos preclínicos capaces de predecir la potencial reactividad inmunológica de fuentes de proteína experimentales (Cordle *et al.*, 1994), como nuevos hidrolizados. Varios métodos *in vitro* e *in vivo* han sido aplicados en la determinación de actividad alérgica residual en fuentes proteicas.

4.3.1.- Métodos *in vitro*

La determinación del perfil de pesos moleculares mediante técnicas cromatográficas de los fragmentos peptídicos presentes en los hidrolizados de proteína no permite alcanzar conclusiones sobre la potencial alergenicidad de los mismos, ya que estos métodos no tienen sensibilidad para detectar cantidades muy pequeñas de fragmentos con alto peso molecular que podrían ser suficientes para provocar una respuesta alérgica.

El *Western blotting* permite detectar cantidades muy pequeñas de proteína y fracciones proteicas mediante la tinción con anticuerpos específicos; es capaz de detectar estas proteínas o fracciones proteicas en una mezcla compleja, pero tiene el inconveniente de ser una técnica mas cualitativa que cuantitativa. El *Immunoblotting* presenta frente al *Western* la ventaja de utilizar anticuerpos humanos frente a proteínas intactas residuales o péptidos para su detección en los hidrolizados (Restani *et al.*, 1995).

El EAST (Enzyme-allergosorbent-test) sigue los principios de un ELISA pero utilizando anticuerpos humanos para la detección de proteínas potencialmente alergénicas en fórmulas basadas en hidrolizados.

El ELISA competitivo o de inhibición proporciona una medida de antigenicidad, la cual está relacionada con la potencial alergenicidad de los productos; ha sido clasificado como excelente predictor de hipoalergenicidad (Cordle, 1994). Proporciona una medida de concentración de proteína inmunológicamente activa, no necesariamente intacta. El método de ELISA competitivo mide la capacidad de las moléculas (antígenos) para interaccionar con anticuerpos inmunológicamente específicos. Dicha capacidad está determinada por la estructura química tridimensional de pequeños segmentos reconocidos por el anticuerpo (epítomos) (Cordle *et al.*, 1994). Los parámetros que caracterizan este procedimiento están íntimamente relacionados con la potencia y especificidad del anticuerpo primario, anti-proteína estándar, y la pureza y estabilidad de dicha proteína.

4.3.2.- Métodos *in vivo*:

También mediante métodos *in vivo* se ha tratado de evaluar la potencial alergenicidad de hidrolizados proteicos o productos basados en ellos.

El modelo desarrollado en ratas Brown Norway mimetiza muy bien lo que sucede en humanos, aunque algunos alérgenos bien conocidos no producen respuesta en un número apreciable de animales, lo que podría generar resultados falsos negativos. En este modelo las ratas son sensibilizadas, vía oral y sin adyuvantes, a proteínas alimentarias. Los animales así sensibilizados desarrollan anticuerpos específicos IgE e IgG, capaces de reconocer las mismas proteínas que los anticuerpos de pacientes alérgicos a esos alimentos; y muestran un incremento de la permeabilidad intestinal y un descenso de la frecuencia respiratoria y la presión sistólica sanguínea al ser expuestas al alérgeno vía oral (Knippels *et al.*, 2004).

Los modelos en ratón vía oral necesitan del uso de adyuvantes debido a la tendencia innata de estos animales a desarrollar tolerancia oral a los antígenos ingeridos. Las principales ventajas de estos modelos son la sensibilización vía oral y el que la respuesta sea mediada por IgE, como sucede en humanos (Li *et al.*, 1999; Von-derweid *et al.*, 2001).

Finalmente, el modelo de hiperinmunización en cobayas tiene la ventaja de que la sensibilización se produce vía oral sin ayuda de adyuvantes, lo que lo asemeja más a la situación fisiológica normal en que se desarrolla la alergia a las proteínas de leche de vaca. Sin embargo este modelo tiene la desventaja de que la respuesta esta mediada por IgG1a (Fritsche, 2003).

Material y métodos

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. EVALUACIÓN NUTRICIONAL

Evaluación de la calidad nutricional de la proteína

(Experimento 1)

La valoración de la calidad nutricional de una mezcla de hidrolizados de caseína y de proteína sérica, así como de la mezcla de ambas proteínas intactas, y de caseína intacta por separado, se realizó en función de los valores obtenidos para los siguientes índices: digestibilidad, utilización neta de la proteína, valor biológico y coeficiente de eficacia en crecimiento.

-Animales

Se utilizaron 30 ratas Wistar, la mitad de cada sexo, de 21 días de edad, suministradas por Harlan Iberica (Barcelona). Los animales fueron alojados individualmente en jaulas metabólicas, para controlar la ingesta de alimento y la excreción de heces y orina. Se mantuvieron en una habitación aclimatada a 22° C con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

-Dietas

Las cuatro dietas empleadas diferían entre sí en la fuente proteica tanto cualitativa como cuantitativamente: 4% de caseinato cálcico, L-25-1011203-3 suministrado por Arla Foods (Viby, Dinamarca) (dieta 1), 12% de caseinato cálcico (dieta 2), 12% de una mezcla de proteína sérica baja en lactosa, L-9135200 de Milei (Leutkirch, Alemania) y caseinato cálcico, en proporciones 70:30 (dieta 3) y 12% de una mezcla de hidrolizado de proteína sérica baja en lactosa, Peptigen IF-3002 L-25-10108401 de Arla Foods, e hidrolizado de caseína, CE90STL L-E811 de DMV (Veghel, Holanda) en proporciones 70:30 (dieta 4). La composición de las dietas, así como del corrector vitamínico 1, se muestran en las Tablas 3 a 7. La elección de las proporciones de la mezcla de hidrolizados de proteína sérica y caseína, 70:30 se basó en que dicha mezcla es la que más se aproxima en cuanto a

composición de aminoácidos a la de la leche humana (Koleztko *et al.*, 2005) como podemos ver en las figuras 6, 7 y 8.

-Diseño experimental y metodología

El experimento de evaluación de la calidad nutricional de las dietas objeto de estudio se llevó a cabo en dos periodos (Fig. 9), siguiendo la técnica de Thomas-Mitchell [Mitchell, 1923].

Durante un periodo endógeno inicial de seis días, todos los animales fueron alimentados con la dieta 1, que contenía un 4% de caseína. Los tres primeros días se consideraron de adaptación a la dieta. En los siguientes se recogieron muestras para la determinación del nitrógeno fecal y urinario. Esta proporción de un 4% de proteína es considerada límite para que no se produzca excreción de nitrógeno proteico procedente de la dieta, con lo que los valores de nitrógeno urinario y fecal obtenidos durante este periodo se consideran no derivados del alimento ingerido (procedentes de descamaciones, secreciones, etc.). La obtención de estos valores nos permitió un cálculo más exacto de los índices evaluados.

Tras el periodo endógeno, los animales fueron divididos en tres grupos de 10 individuos pareados por peso y sexo. Durante el periodo fundamental, que tuvo una duración total de 10 días, todos los animales recibieron las dietas con un 12 % de proteína: dieta 2, con caseína, en el caso del grupo 1, dieta 3, con una mezcla de caseína con proteína sérica, para el grupo 2; y dieta 4, con una mezcla de hidrolizados de caseína y proteína sérica, para el grupo 3.

El periodo fundamental incluyó también un periodo de adaptación de tres días; posteriormente se controló la ingesta e incremento de peso de los animales, recogándose además muestras para la determinación del nitrógeno fecal y urinario.

El nitrógeno fecal y urinario fue cuantificado mediante una adaptación del método Kjeldahl empleando selenio negro como catalizador, [AOAC, 2000 a].

-Cálculos

Los índices de calidad nutricional de la proteína se calcularon según las siguientes fórmulas:

Coefficiente de digestibilidad verdadera (CDV)

$$CDV = \frac{N \text{ absorbido}}{N \text{ ingerido}} \times 100 = \frac{(I - (F - Fe))}{I} \times 100$$

Utilización neta de la proteína (NPU)

$$NPU = \frac{N \text{ retenido}}{N \text{ ingerido}} \times 100 = \frac{(I - (F - Fe) - (U - Ue))}{I} \times 100$$

Valor biológico de la proteína (VB)

$$VB = \frac{N \text{ retenido}}{N \text{ absorbido}} \times 100 = \frac{(I - (F - Fe) - (U - Ue))}{(I - (F - Fe))} \times 100$$

Coefficiente de eficacia en crecimiento (PER)

$$PER = \frac{\text{Incremento de peso del animal (gramos)}}{\text{Proteína ingerida en el mismo periodo (gramos)}}$$

Siendo:

I = Nitrógeno ingerido (mg/día).

F = Nitrógeno en heces (mg/día).

Fe = Nitrógeno en heces durante el periodo endógeno (mg/día).

U = Nitrógeno en orina (mg/día).

U e = Nitrógeno en orina durante el periodo endógeno (mg/día).

Tabla 3: Composición de la dieta 1, con **caseinato cálcico** de Arla Foods, L-25-10111203-3, administrada durante el periodo endógeno.

INGREDIENTES		COMPOSICIÓN QUÍMICA	
	Cantidad /Kg		%
Caseinato cálcico	44.97 g	Proteína	4.54
Almidón de maíz	520.63 g	Hidratos de carbono	77.76
Maltodextrinas	132.00 g	Materia grasa	7.40
Celulosa	50.00 g	Humedad	7.67
Sacarosa	100.00 g	Cenizas	2.63
Aceite de soja	69.49 g		mg/100g
Cloruro de colina	1.41 g	Sodio	82
L -Cisteína	3.00 g	Potasio	580
Corrector vitamínico	50.00 g	Calcio	516
Fosfato dibásico de potasio	9.68 g	Magnesio	61
Carbonato cálcico	7.37 g	Cloruros	170
Fosfato dibásico de calcio	5.01 g	Fósforo	348
Cloruro de magnesio •6 H ₂ O	3.46 g	Hierro	1.8
Fosfato dibásico de sodio •2 H ₂ O	1.69 g	Zinc	3.9
Sulfato de magnesio•7 H ₂ O	900.33 mg		µg/100g
Lactato de hierro (II)•2 H ₂ O	218.46 mg	Manganeso	690
Sulfato de zinc •H ₂ O	101.69 mg	Cobre	294
Sulfato de manganeso • H ₂ O	30.13 mg	-	-
Sulfato de cobre (II) •5 H ₂ O	23.57 mg	-	-
Sulfato de cromo y potasio •12 H ₂ O	9.80 mg	-	-
Fluoruro sódico	2.25 mg	-	-
Selenato sódico	435.06 µg	-	-
Molibdato sódico• 2 H ₂ O	380.18 µg	-	-
Yoduro potásico	264.26 µg	-	-

Tabla 4: Composición de la dieta 2, administrada durante el periodo fundamental con **caseinato cálcico** de Arla Foods, L-25-10111203-3, como fuente proteica.

INGREDIENTES		COMPOSICIÓN QUÍMICA	
	Cantidad /Kg		%
Caseinato cálcico	134.92 g	Proteína	12.57
Almidón de maíz	435.54 g	Hidratos de carbono	77.76
Maltodextrinas	132.00 g	Materia grasa	7.40
Celulosa	50.00 g	Humedad	7.67
Sacarosa	100.00 g	Cenizas	2.63
Aceite de soja	68.47 g		mg/100g
Cloruro de colina	1.41 g	Sodio	82
L -Cisteina	3.00 g	Potasio	580
Corrector vitamínico	50.00 g	Calcio	516
Fosfato dibásico de potasio	9.32 g	Magnesio	62
Carbonato cálcico	6.59 g	Cloruros	170
Fosfato dibásico de calcio	2.04 g	Fósforo	349
Cloruro de magnesio •6 H ₂ O	3.22 g	Hierro	1.8
Fosfato dibásico de sodio •2 H ₂ O	1.69 g	Zinc	3.9
Sulfato de magnesio •7 H ₂ O	1.12 g		µg/100g
Lactato de hierro (II) •2 H ₂ O	211.36 mg	Manganeso	690
Sulfato de zinc•H ₂ O	92.22 mg	Cobre	294
Sulfato de manganeso •H ₂ O	30.87 mg	-	-
Sulfato de cobre (II) •5 H ₂ O	22.86 mg	-	-
Sulfato de cromo y potasio •12 H ₂ O	9.80 mg	-	-
Fluoruro sódico	2.25 mg	-	-
Selenato sódico	435.06 µg	-	-
Molibdato sódico •2 H ₂ O	380.18 µg	-	-
Yoduro potásico	264.26 µg	-	-

Tabla 5: Composición de la dieta 3, administrada durante el periodo fundamental, con **caseinato cálcico** de Arla Foods, L-25-10111203-3, y **proteína sérica** baja en lactosa de Milei, L-9135200, como fuentes proteicas.

INGREDIENTES		COMPOSICIÓN QUÍMICA	
	Cantidad /Kg		%
Proteína de suero lácteo	109.36 g	Proteína	12.71
Caseinato cálcico	40.48 g	Hidratos de carbono	70.33
Almidón de maíz	425.29 g	Materia grasa	7.29
Maltodextrinas	132.00 g	Humedad	7.19
Celulosa	50.00 g	Cenizas	2.48
Sacarosa	100.00 g		mg/100g
Aceite de soja	64.18 g	Sodio	725
Colina cloruro	1.41 g	Potasio	525
L -Cisteína	3.00 g	Calcio	493
Corrector vitamínico	50.00 g	Magnesio	58
Fosfato dibásico de potasio	7.88 g	Cloruros	153
Carbonato cálcico	4.92 g	Fósforo	337
Fosfato dibásico de calcio	6.16 g	Hierro	1.4
Cloruro de magnesio •6 H ₂ O	3.34 g	Zinc	4.2
Fosfato dibásico de sodio •2 H ₂ O	1.32 g		µg/100g
Sulfato de magnesio •7 H ₂ O	270.25 mg	Manganeso	984
Lactato de hierro (II) •2 H ₂ O	214.37 mg	Cobre	247
Sulfato de zinc •H ₂ O	101.00 mg	-	-
Sulfato de manganeso •H ₂ O	30.15 mg	-	-
Sulfato de cobre (II) •5 H ₂ O	20.99 mg	-	-
Sulfato de cromo y potasio •12 H ₂ O	9.80 mg	-	-
Fluoruro sódico	2.25 mg	-	-
Selenato sódico	435.06 µg	-	-
Molibdato sódico •2 H ₂ O	380.18 µg	-	-
Yoduro potásico	264.26 µg		

Tabla 6: Composición de la dieta 4, administrada durante el periodo fundamental con **hidrolizado de caseína** de DMV, CE90STL L-E811, e **hidrolizado de proteína sérica** baja en lactosa de Arla Foods, Peptigen IF-3002 L-25-10108401, como fuentes proteicas.

INGREDIENTES		COMPOSICIÓN QUÍMICA	
	Cantidad /Kg		%
Hidrolizado prot. suero lácteo	99.97 g	Proteína	12.48
Hidrolizado de caseína	43.18 g	Hidratos de carbono	70.17
Almidón de maíz	430.90 g	Materia grasa	7.65
Maltodextrinas	132.00 g	Humedad	7.31
Celulosa	50.00 g	Cenizas	2.39
Sacarosa	100.00 g		mg/100g
Aceite de soja	69.49 g	Sodio	188
Colina cloruro	1.41 g	Potasio	465
L -Cisteína	3.00 g	Calcio	477
Corrector vitamínico	50.00 g	Magnesio	61
Fosfato dibásico de potasio	2.28 g	Cloruros	182
Carbonato cálcico	4.51 g	Fósforo	290
Fosfato dibásico de calcio	8.58 g	Hierro	6.4
Cloruro de magnesio •6 H ₂ O	3.34 g	Zinc	4.8
Fosfato dibásico de sodio•2 H ₂ O	1.32 g		µg/100g
Sulfato de magnesio •7 H ₂ O	945.14 mg	Manganeso	683
Lactato de hierro (II) •2 H ₂ O	209.35 mg	Cobre	487
Sulfato de zinc• H ₂ O	103.59 mg	-	-
Sulfato de manganeso •H ₂ O	28.14 mg	-	-
Sulfato de cobre (II) •5 H ₂ O	23.31 mg	-	-
Sulfato de cromo y potasio•12 H ₂ O	9.80 mg	-	-
Fluoruro sódico	2.25 mg	-	-
Selenato sódico	435.06 µg	-	-
Molibdato sódico •2 H ₂ O	380.18 µg	-	-
Yoduro potásico	264.26 µg		

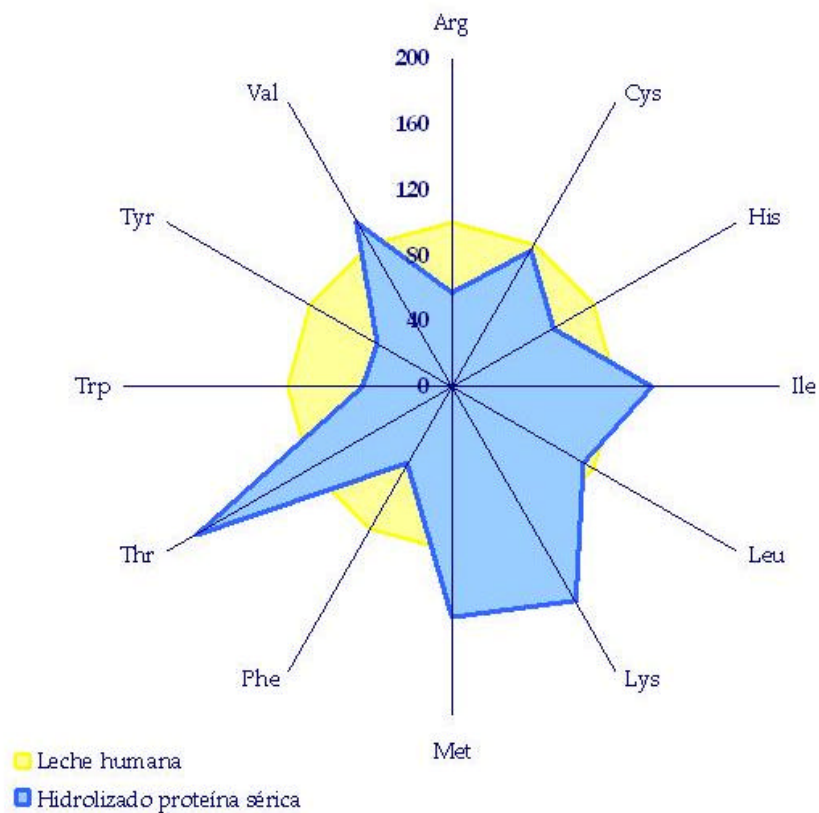


Figura 6: Comparación de la composición de aminoácidos del hidrolizado de proteína sérica bajo en lactosa (azul) Peptigen IF-3002 L-0008000101 de Arla Foods (Viby, Dinamarca) (datos proporcionados por el proveedor), respecto a la leche humana (amarillo) (Koletzko *et al.*, 2005).

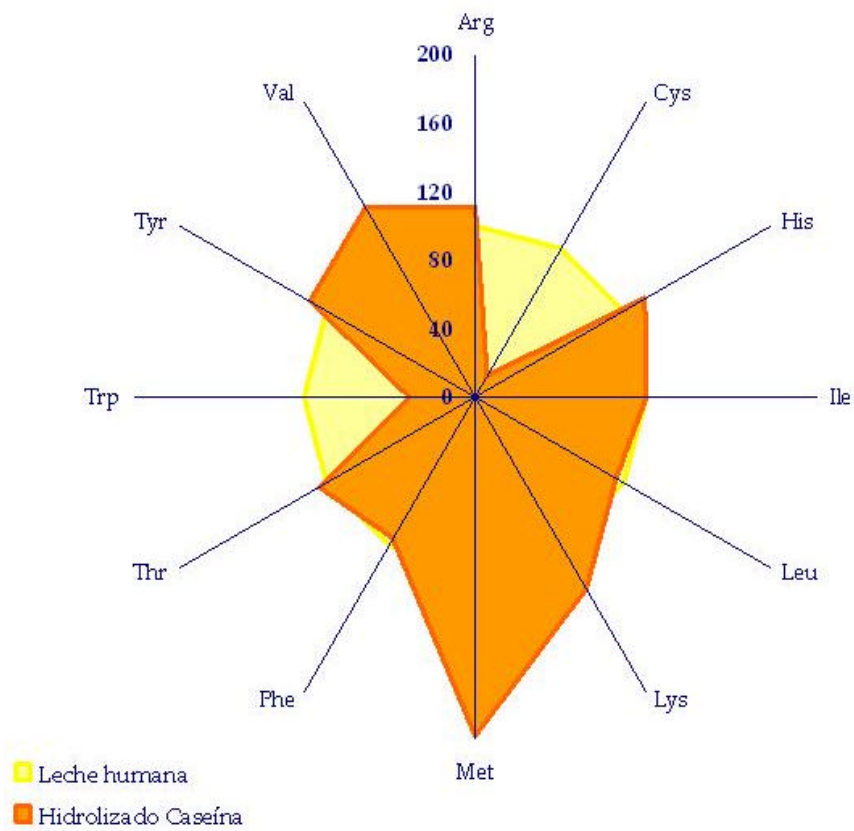


Figura 7: Comparación de la composición de aminoácidos del hidrolizado de caseína (naranja) CE90STL L-M925 de DMV (Veghel, Holanda) (datos proporcionados por el proveedor), respecto a la leche humana (amarillo) (Koletzko *et al.*, 2005).

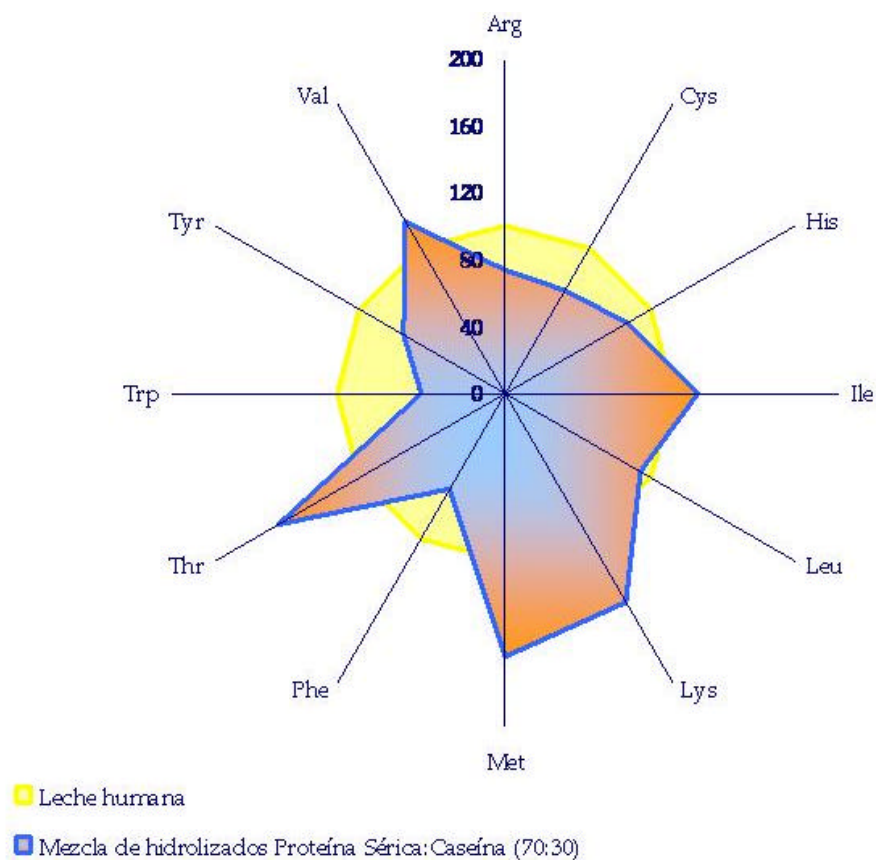
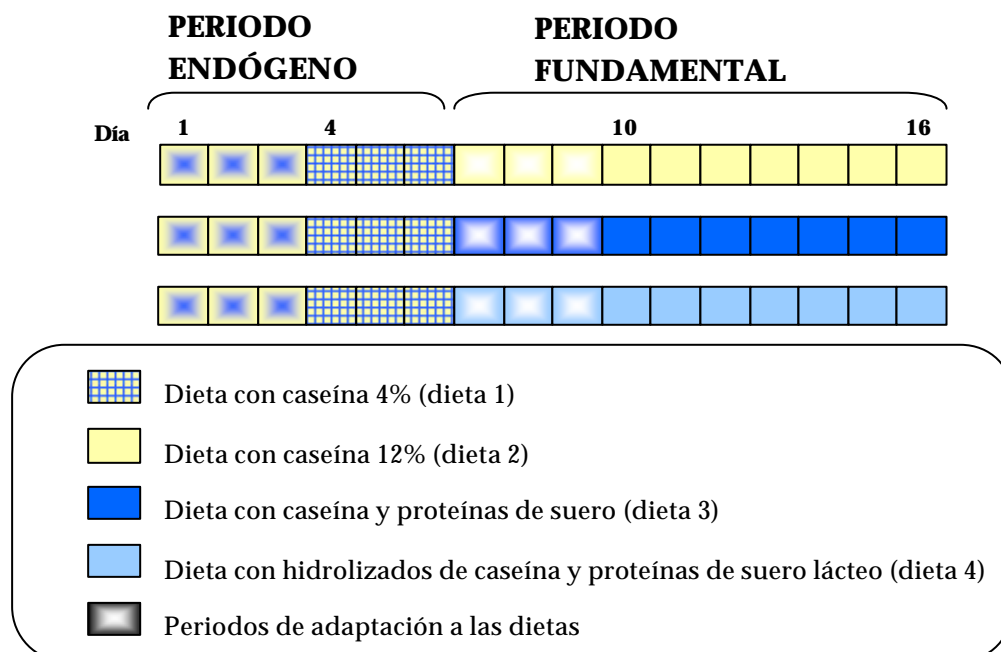


Figura 8: Comparación de la composición de aminoácidos de la mezcla 70:30 (naranja y azul) del hidrolizado de proteína sérica bajo en lactosa Peptigen IF-3002 L-0008000101 de Arla Foods (Viby, Dinamarca) y el hidrolizado de caseína CE90STL L-M925 de DMV (Veghel, Holanda)(datos proporcionados por los proveedores), respecto a la leche humana (amarillo)(Koletzko *et al.*, 2005).

Tabla 7: Composición del corrector vitamínico 1 utilizado en las dietas de ratas.

COMPONENTES	Cantidad por Kg
Acetato de α -tocoferol	141.35 mg
Nicotinamida	30.00 mg
Pantotenato cálcico	16.00 mg
Cianocobalamina	10.00 mg
Acetato de retinol	13.38 mg
Colecalciferol	12.08 mg
Biotina	0.20 mg
Tiamina clorhidrato	6.00 mg
Riboflavina	6.00 mg
Piridoxina clorhidrato	7.00 mg
Menadiona	2.75 mg
Ácido fólico	2.00 mg
Almidón de maíz	49.75 g

**Figura 9:** Diseño experimental empleado para la determinación de la calidad proteica.

Evaluación de la calidad nutricional de la proteína

(Experimento 2)

Se realizó una segunda valoración independiente de la calidad de la proteína de los hidrolizados de caseína y proteína sérica y de sus respectivas proteínas de origen. Dicha valoración se realizó en función del valor obtenido para el coeficiente de eficacia en crecimiento y el perfil de aminoácidos libres en muestras de plasma, hígado y músculo, en los animales alimentados con estas proteínas.

-Animales

Se utilizaron 50 ratas Sprague-Dawley, machos, de 21 días de edad, suministradas por Harlan Iberica (Barcelona). Los animales fueron alojados individualmente en jaulas metabólicas, para controlar la ingesta de alimento en una habitación aclimatada a 22° C con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

-Dietas

Las cinco dietas utilizadas diferían entre sí en la fuente proteica: caseína de referencia ANRC suministrada por New Zealand Milk Products (Petaluma, USA) (dieta A), caseína Alacid 741 L-T4021 de DMV (dieta B), hidrolizado de caseína CE90STL L-M925 de DMV (dieta C), proteína sérica baja en lactosa L-10540 de Arla Foods (dieta D) e hidrolizado de proteína sérica bajo en lactosa Peptigen IF-3002 L-0008000101 de Arla Foods (dieta E). La composición de las dietas, así como del corrector vitamínico 2 y el corrector mineral se muestran en las Tablas 9 a 15. La tabla 16 muestra la composición en aminoácidos de cada dieta (datos proporcionados por los proveedores).

-Diseño experimental y metodología

Este experimento se llevó a cabo siguiendo el método oficial de la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), [AOAC, 2000 b], según el cual todos los grupos de estudio deben ser comparados con uno mantenido en las mismas condiciones alimentado con una dieta de referencia cuya fuente proteica es la caseína denominada ANRC de New Zealand

Milk Products. Tras un periodo de adaptación de una semana, los animales fueron divididos en cinco grupos pareados por peso, de modo que la diferencia en peso medio entre grupos no superase los 5 g. Cada grupo fue alimentado durante 28 días con dietas con distinta fuente proteica: caseína ANRC (grupo 1), caseína (grupo 2), hidrolizado de caseína (grupo 3), proteínas séricas (grupo 4) e hidrolizado de proteínas séricas (grupo 5).

Se controló la ingesta e incremento de peso de los animales con una frecuencia no superior a días alternos.

-Cálculo del coeficiente de eficacia en crecimiento

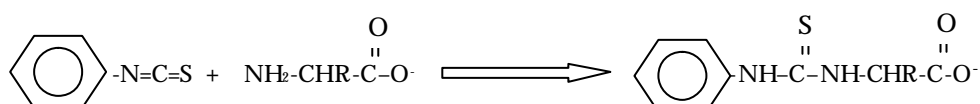
El coeficiente de eficacia en crecimiento (PER) se calculó según la formula:

$$PER = \frac{\text{Incremento de peso del animal (gramos)}}{\text{Proteína ingerida en el mismo periodo (gramos)}}$$

Los resultados se expresaron como valor absoluto y como porcentaje relativo, tomando como referencia el grupo de caseína ANRC.

-Determinación del perfil de aminoácidos libres en plasma, hígado y músculo

El análisis de aminoácidos libres en muestras de plasma, hígado y músculo, se llevó a cabo de acuerdo con el método Pico-Tag®, para el análisis de aminoácidos fisiológicos de Waters (Milford, USA), (Cohen et al, 1989). Este método se basa en la reacción del fenilisotiocianato con los aminoácidos, formando feniltiocarbamil derivados según la reacción:



Una vez formados, los derivados fueron separados por cromatografía de alta resolución (HPLC), en una columna de octadecilsilica y detectados por un espectrofotómetro a 254 nm. Se determinó la concentración proteica en hígado y músculo, con el fin de expresar

los resultados de concentración de aminoácidos en función de la cantidad de proteínas totales en dichos tejidos.

-Obtención de muestras

Las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una solución de Pentothal® sódico (Abbott Laboratories, Madrid, España) diluido en solución salina isotónica a una concentración final de 62.5 mg/ml. Se administró una dosis aproximada de 31.25 mg por cada 100 g de peso del animal.

La sangre se extrajo con una jeringa de 2 ml directamente del corazón, se vertió en tubos con EDTA y se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos. El plasma se recogió con ayuda de pipetas Pasteur, separándose dos alícuotas del plasma de cada animal.

Para la obtención de las muestras de hígado se practicó una incisión abdominal a través de la cual se obtuvo una muestra de los lóbulos medios del hígado. La muestra se dividió en dos alícuotas iguales.

Las muestras de músculo se tomaron, retirando la piel de la región femoral de una de las patas y extrayéndose íntegro el músculo gastrocnémico. La muestra se dividió en dos alícuotas iguales.

Las muestras de plasma, hígado y músculo se guardaron en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml, se congelaron rápidamente mediante su inmersión en nitrógeno líquido y se conservaron a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

-Preparación de las muestras

Muestras de plasma

Se tomaron 100 μl de plasma y se mezclaron con un volumen equivalente de patrón interno, metionín-sulfona 0.4 mM en HCl 0.1 N. La mezcla fue filtrada a través de filtros Ultrafree®-0.5, (Millipore, Bedford, USA) en una microcentrifuga a 12000 rpm durante 12

minutos para eliminar el material de elevado peso molecular, principalmente proteínas. El filtrado se recogió para su posterior análisis.

Muestras de hígado y músculo

Se procedió a la homogeneización en un homogeneizador mecánico con pistilo de teflón en baño de hielo. Se tomaron fracciones de 200 mg de tejido sobre las que se añadió 1 ml de patrón interno, metionín-sulfona (Sigma, St. Louis, USA) 0.8 mM en HCl 0.1 N. En el caso del hígado el patrón interno contenía metionín-sulfona 0.8 mM y nor-leucina (Sigma) 0.8 mM (1:1) en HCl 0.1 N. Las muestras de músculo se diluyeron además con 1 ml de HCl 0.1 N. De ambos tipos de muestras se filtraron 500 µl de homogeneizado del mismo modo descrito previamente para las muestras de plasma, recogándose el filtrado para su análisis.

-Conversión de los aminoácidos en feniltiocarbamil derivados

Conjuntamente con las muestras anteriormente citadas (plasma, hígado y músculo) se derivatizó un patrón de aminoácidos fisiológicos (Sigma), compuesto de una mezcla 1:1 (v/v) de patrón de aminoácidos (mezcla de aminoácidos ácidos y neutros, básicos y HCl 0.1 N en proporción 1:1:3 (v/v/v)), y el correspondiente patrón interno para cada tipo de muestra.

Se dispensaron 25 µl de las muestras y de los patrones en tubos de vidrio de 5 x 50 mm. Los tubos con el patrón de aminoácidos y con las distintas muestras se secaron a vacío y se les añadieron 10 µl de solución desecante compuesta por una mezcla de metanol-agua-trietilamina 2:1:1 (v/v/v). Tras 20 minutos de secado a vacío, se adicionaron 20 µl de agente derivatizante, compuesto de una mezcla de metanol-agua-fenilisotiocianato-trietilamina 7:1:1:1 (v/v/v/v). Transcurridos 20 minutos de reacción, el exceso de reactivo se eliminó mediante secado a vacío durante 90 minutos.

-Análisis mediante HPLC de los feniltiocarbamil derivados

Las muestras derivatizadas se resuspendieron en 100 μ l de tampón de disolución, suministrado por Waters, inyectándose 10 μ l en un sistema de cromatografía de alta resolución en fase reversa.

El sistema cromatográfico estaba formado por un equipo Alliance 2695, una columna Pico-Tag® de 30 cm de longitud y un detector de ultravioleta modelo 2487, todo ello de la firma Waters.

Se utilizó el sistema binario de gradientes mostrado en la tabla 8, combinando las fases móviles que se describen a continuación:

Fase móvil A: acetato sódico trihidrato 70 mM con pH 6.55 ajustado con ácido acético y con un 2.5 % (v/v) de acetonitrilo. La fase fue filtrada a través de una membrana de 0.45 μ m de poro y desgasificada.

Fase móvil B: acetonitrilo-agua-metanol 9:8:3 (v/v/v), desgasificada.

Los aminoácidos fueron detectados a 254 nm de longitud de onda a la salida de la columna. El equipo estaba conectado a un sistema de registro Millennium 32, (Waters), que proporcionó los cromatogramas, y calculó el área de cada pico y su tiempo de retención.

La cuantificación se llevó a cabo comparando cada muestra con un cromatograma patrón, teniendo en cuenta el área relativa de cada pico y la recuperación del patrón interno. La concentración de cada aminoácido se expresó en milimoles por litro de plasma, y en milimoles por gramo de proteína en hígado y músculo.

Tabla 8: Gradiente de fases móviles para el análisis del perfil de aminoácidos libres mediante HPLC. (Fase móvil A: acetato sódico trihidrato 70 mM, 2.5 % (v/v) de acetonitrilo, pH 6.55. Fase móvil B: acetonitrilo-agua-metanol 9:8:3 (v/v/v)).

Tiempo (minutos)	Flujo (ml/minuto)	% Fase A	% Fase B	Curva
Inicial	1.0	100	0	-
13.5	1.0	97	3	11
24.0	1.0	94	6	8
30.0	1.0	91	9	5
50.0	1.0	66	34	6
60.0	1.0	66	34	6
60.5	1.0	0	100	6
66.0	1.0	0	100	6
67.0	1.0	100	0	6

-Determinación de la concentración proteica

La concentración proteica de los homogeneizados de hígado y músculo, se determinó en placas multipocillo por el método de Bradford (1976). Este método está basado en la reacción entre el azul de Coomasie y el enlace peptídico de las proteínas, formando un complejo coloreado que presenta un máximo de absorción a 595 nm.

Las muestras de homogeneizados de hígado se diluyeron 1/100 mientras que las de músculo se diluyeron 1/50, en ambos casos con agua desionizada. Para la determinación de la concentración se dispensaron, por triplicado, 40 µl de la dilución de la muestra, a los que se añadieron 220 µl de reactivo para cuantificación de proteínas, (Bio-Rad, Munich, Alemania) diluido 1/5 con agua desionizada. Tras 10 minutos de reacción, se midió absorbancia a 595 nm en el lector de placas multipocillo IEMS Reader Labsystem, (Helsinki, Finlandia).

La concentración de cada muestra se determinó a partir de una recta patrón elaborada con distintas concentraciones de albúmina sérica bovina (Sigma).

-Cálculo de relaciones entre diversos grupos de aminoácidos

Relación NE/E: Relación entre la suma de las concentraciones de los aminoácidos no esenciales (NE) y la suma de las concentraciones de los aminoácidos esenciales (E).

Relación entre las concentraciones de fenilalanina y tirosina (Phe/Tyr).

Relación entre las concentraciones de alanina y treonina (Ala/Thr).

Relación entre las concentraciones de alanina y leucina (Ala/Leu).

Suma de las concentraciones de los aminoácidos de cadena ramificada (BCA): valina, isoleucina y leucina.

Relación entre las concentraciones de alanina y los aminoácidos de cadena ramificada (Ala/BCA).

Relación entre la suma de las concentraciones de serina, glicina y alanina, y los aminoácidos de cadena ramificada (Ser+Gly+Ala/ BCA).

Relación entre las concentraciones de glicina y valina (Gly/Val).

Tabla 9: Composición de la dieta A, con **caseína ANRC** de New Zealand Milk Products , como fuente proteica.

INGREDIENTES		COMPOSICIÓN QUÍMICA	
	g/Kg		%
Caseína ANRC	111.43	Proteína	10.69
Almidón de maíz	639.48	Hidratos de carbono	68.38
Celulosa microcristalina	10.00	Materia grasa	8.08
Sacarosa	100.00	Humedad	8.36
Aceite de soja	80.00	Cenizas	4.49
Corrector vitamínico	10.00		mg/100g
Corrector mineral	49.09	Sodio	298
-	-	Potasio	869
-	-	Calcio	698
-	-	Magnesio	62
-	-	Cloruros	525
-	-	Fósforo	420
-	-	Hierro	6.2
-	-	Zinc	0.9
-	-	Manganeso	5.6
-	-	Cobre	0.7

Tabla 10: Composición de la dieta B, con **caseína** Alacid 741 L-T4021 de DMV, como fuente proteica.

INGREDIENTES		COMPOSICIÓN QUÍMICA	
	g/Kg		%
Caseína	113.99	Proteína	10.78
Almidón de maíz	639.99	Hidratos de carbono	68.73
Celulosa microcristalina	10.00	Materia grasa	8.09
Sacarosa	100.00	Humedad	8.13
Aceite de soja	80.00	Cenizas	4.27
Corrector vitamínico	10.00		mg/100g
Corrector mineral	46.32	Sodio	294
-	-	Potasio	775
-	-	Calcio	624
-	-	Magnesio	60
-	-	Cloruros	503
-	-	Fósforo	399
-	-	Hierro	7.5
-	-	Zinc	0.9
-	-	Manganeso	4.8
-	-	Cobre	0.5

Tabla 11: Composición de la dieta C, con **hidrolizado de caseína** CE90STL L-M925 de DMV, como fuente proteica.

INGREDIENTES		COMPOSICIÓN QUÍMICA	
	g/Kg		%
Hidrolizado de Caseína	125.56	Proteína	10.28
Almidón de maíz	629.46	Hidratos de carbono	68.28
Celulosa microcristalina	10.00	Materia grasa	8.33
Sacarosa	100.00	Humedad	8.16
Aceite de soja	80.00	Cenizas	4.95
Corrector vitamínico	10.00		mg/100g
Corrector mineral	44.98	Sodio	423
-	-	Potasio	1045
-	-	Calcio	645
-	-	Magnesio	52
-	-	Cloruros	500
-	-	Fósforo	420
-	-	Hierro	7.9
-	-	Zinc	0.7
-	-	Manganeso	4.9
-	-	Cobre	0.5

Tabla 12: Composición de la dieta D, con **proteína sérica** baja en lactosa L-10540 de Arla Foods, como fuente proteica.

INGREDIENTES		COMPOSICIÓN QUÍMICA	
	g/Kg		%
Proteína sérica	128.06	Proteína	10.46
Almidón de maíz	625.06	Hidratos de carbono	68.59
Celulosa microcristalina	10.00	Materia grasa	8.70
Sacarosa	100.00	Humedad	7.74
Aceite de soja	80.00	Cenizas	4.51
Corrector vitamínico	10.00		mg/100g
Corrector mineral	46.52	Sodio	294
-	-	Potasio	883
-	-	Calcio	689
-	-	Magnesio	63
-	-	Cloruros	486
-	-	Fósforo	371
-	-	Hierro	6.3
-	-	Zinc	0.6
-	-	Manganeso	5.2
-	-	Cobre	0.5

Tabla 13: Composición de la dieta E, con **hidrolizado de proteína sérica** bajo en lactosa Peptigen IF-3002 L-0008000101 de Arla Foods, como fuente proteica.

INGREDIENTES		COMPOSICIÓN QUÍMICA	
	g/Kg		%
Hidrolizado de proteína sérica	121.45	Proteína	10.17
Almidón de maíz	635.23	Hidratos de carbono	68.78
Celulosa microcristalina	10.00	Materia grasa	8.28
Sacarosa	100.00	Humedad	8.19
Aceite de soja	80.00	Cenizas	4.58
Corrector vitamínico	10.00		mg/100g
Corrector mineral	43.32	Sodio	314
-	-	Potasio	875
-	-	Calcio	670
-	-	Magnesio	55
-	-	Cloruros	450
-	-	Fósforo	344
-	-	Hierro	6.6
-	-	Zinc	0.5
-	-	Manganeso	4.7
-	-	Cobre	0.5

Tabla 14: Composición del corrector mineral utilizado en las dietas de ratas.

COMPONENTES	g/Kg
Fosfato dibásico de potasio	389.00
Carbonato cálcico	381.40
Cloruro sódico	139.30
Sulfato magnésico	57.30
Sulfato férrico 7 H ₂ O	27.00
Sulfato de manganeso 7H ₂ O	4.00
Sulfato de zinc 7H ₂ O	0.55
Sulfato de cobre 5H ₂ O	0.48
Yoduro potásico	0.79
Cloruro de cobalto 6H ₂ O	0.02

Tabla 15: Composición del corrector vitamínico 2, utilizado en las dietas de ratas.

COMPONENTES	mg / Kg
Acetato de α -tocoferol	200.00
Niacinamida	39.91
Pantotenato cálcico	42.08
Cianocobalamina	31.25
Acetato de retinol	61.54
Colecalciferol	18.00
Biotina	0.41
Clorhidrato de tiamina	5.34
Riboflavina	8.29
Clorhidrato de piridoxina	5.08
Menadiona	5.00
Ácido fólico	2.21
Inositol	103.09
Cloruro de colina	2749.11
Almidón de maíz	6728.69

Tabla16: Composición de aminoácidos de las distintas fuentes proteicas evaluadas:

Aminoácido	Dieta A	Dieta B	Dieta C	Dieta D	Dieta E
Ala	29	28	30	46	50
Gly	18	9	17	33	16
Ile	51	62	51	65	62
Leu	93	105	89	104	87
Val	63	79	64	35	58
Cys	2	1	3	54	20
Met	25	15	27	15	19
Phe	51	29	43	48	24
Trp	13	8	7	30	10
Tyr	55	53	46	43	22
Arg	37	25	35	41	18
His	29	27	26	19	16
Lys	81	55	82	97	95
Asp	69	57	60	123	113
Glu	231	192	227	130	193
Ser	49	38	53	49	52
Thr	39	48	45	43	77
Pro	103	169	95	26	67

Datos proporcionados por los proveedores expresados como mg por g de proteína: dieta A, caseína de referencia ANRC de New Zealand Milk Products (Petaluma, USA); dieta B, caseína Alacid 741 L-T4021 de DMV (Veghel, Holanda); dieta C, hidrolizado de caseína CE90STL L-M925 de DMV; dieta D, proteína sérica baja en lactosa L-10540 de Arla Foods (Viby, Dinamarca) y dieta E, hidrolizado de proteína sérica bajo en lactosa Peptigen IF-3002 L-0008000101 de Arla Foods.

2. EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA

2.1. In vitro

2.1.1. ELISA para la cuantificación de proteína sérica inmunológicamente activa.

El propósito de este estudio fue desarrollar y validar un método de ELISA competitivo, capaz de determinar la antigenicidad de hidrolizados de proteína sérica, potenciales ingredientes en la fabricación de formulas infantiles. El hidrolizado de proteína sérica utilizado en la puesta a punto de este método fue Peptigen IF-3002 de Arla Foods.

El método de ELISA competitivo mide la capacidad de las moléculas (antígenos) para interactuar con anticuerpos inmunológicamente específicos. Dicha capacidad está determinada por la estructura química tridimensional de pequeños segmentos reconocidos por el anticuerpo (epítomos) [Cordle *et al*, 1994]. Los parámetros que caracterizan este procedimiento están íntimamente relacionados con la potencia y especificidad del anticuerpo primario (anti-proteína patrón) y la pureza y estabilidad del antígeno (proteína patrón).

-Diseño experimental y metodología:

Se utilizaron lotes diferentes de un concentrado de proteína sérica (Lacprodan 80k/82k) como proteína patrón (lote 35410) y como control positivo (una mezcla de los lotes 35386, 35393, 35398, 35405). Un lote de hidrolizado de proteína sérica (Peptigen IF-3002, lote 10108401), fue utilizado como hidrolizado control, cuya concentración de proteína sérica inmunológicamente activa (IAW) era conocida. Todos ellos fueron suministrados por Arla Foods.

Se prepararon soluciones de proteína sérica intacta patrón y control, teniendo en cuenta el porcentaje de proteína de los correspondientes lotes, 0.795 mg/mg de peso seco en ambos casos, para obtener una solución patrón en torno a 3 mg/ml y una solución control de aproximadamente 1 mg/ml de proteína sérica intacta. La concentración exacta de estas

soluciones se determinó mediante el método de isoabsorbancia. Dicho método consiste en medir en un espectrofotómetro la absorbancia de distintas diluciones de cada solución cuya concentración proteica se quiere determinar a dos longitudes de onda, 228 nm y 234 nm. Los factores de dilución empleados fueron: 15, 20, 30 y 40; tanto la reconstitución de los concentrados proteicos como las diluciones se hicieron en tampón PBS (NaCl 140 mM, Na₂HCO₄*H₂O 7 mM y NaH₂PO₄*H₂O 3 mM, pH 7).

El ELISA se desarrolló en placas multipocillo Immulon 4 (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA), las cuales se activaron mediante la incubación durante 2.5 horas a temperatura ambiente (23.5° C), con 100 µl por pocillo de una solución de proteína sérica patrón, a una concentración de 150 ng/ml en tampón carbonato/bicarbonato. Este tampón estaba compuesto por Na₂CO₃ 15 mM, NaCO₃ 35 mM y NaN₃ 3 mM, ajustado a pH 9.6.

Tras ser activadas, las placas se lavaron 4 veces con tampón UAB (PBS suplementado con ovoalbúmina al 0.05%, p/v (Sigma) y Tween-20 al 0.1% (Sigma)) en el lavador para placas multipocillo Bio-Tek Elx405 (Winooski, VT, USA).

A continuación, para minimizar las uniones inespecíficas, las placas fueron incubadas de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente con 200 µl por pocillo de solución bloqueante, compuesta por PBS suplementado con ovoalbúmina al 0.07 % (p/v).

Las muestras de hidrolizados, Peptigen IF-3002 L-10206301 (L1) y L-10108401 [hidrolizado control (LHC)], se reconstituyeron a una concentración de 20 mg/ml en tampón UAB y se sometieron a un período de incubación de 15 minutos a 37 °C para su completa disolución. La proteína patrón se diluyó a seis concentraciones distintas entre 3000 ng/ml y 30 ng/ml para generar la curva patrón, y la proteína control positivo a 200 ng/ml, todo ello en tampón UAB.

El procedimiento implica realizar una mezcla de preincubación, como se muestra en la tabla 17. En esta etapa del método, se produce la unión entre la proteína sérica presente en las muestras y el anticuerpo. Esta unión incapacita al anticuerpo para unirse

posteriormente a las placas. Para ello, se tomaron 400 µl de cada dilución de la proteína patrón, del control positivo, del hidrolizado control y de las correspondientes muestras, y se mezclaron con 400 µl de una solución de suero de conejo que contenía el anticuerpo primario, a una dilución 1:200000, durante 2 horas a 37 °C. Este suero fue producido específicamente frente al concentrado de proteína sérica usado como patrón y fue purificado por Ross Laboratories (Columbus, OH, USA).

Tras lavar las placas con tampón UAB, se les añadieron 100 µl por pocillo de cada mezcla de preincubación (por triplicado), según muestra la figura 10, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los inmunocomplejos y el anticuerpo en exceso no unidos a las placas fueron eliminados mediante el tampón de lavado, UAB. Seguidamente se incubaron las placas 1 hora a temperatura ambiente, con 100 µl en cada pocillo de una solución de anticuerpo secundario, suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Biodesign, Kennebunk, ME, USA) diluido 1:20000 en tampón SAB (PBS suplementado con ovoalbúmina al 0.1 % (p/v) y Tween-20 al 0.1 %).

Después de lavar de nuevo las placas con tampón de lavado UAB, éstas se incubaron durante 10 minutos exactos con 100 µl por pocillo de una solución que contenía el sustrato para el enzima acoplado al anticuerpo secundario. Dicha solución estaba compuesta por una mezcla a partes iguales de TMB (3,3', 5,5' Tetrametilbencidina) y solución B sustrato de peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories. Gaithersburg, MD, USA). La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de una solución de ácido fosfórico 1 M y se midió absorbancia a 450 nm en el lector de placas multipocillo IEMS Reader Labsystem.

-Cálculo de la concentración de proteína sérica inmunológicamente activa

Una vez corregidos los valores de absorbancia sustrayendo el blanco y obtenido el valor medio para cada triplete de pocillos, se calculó el valor de inhibición. Dicho valor se obtuvo a través de la relación entre la absorbancia media de cada triplete de pocillos y la absorbancia máxima. Dicha absorbancia resulta de la mezcla de preincubación que no

contiene proteína sérica, donde no hay inhibición específica de la unión del anticuerpo primario a la proteína fijada en la placa.

A continuación se generó una curva patrón mediante un ajuste cuadrático entre el logaritmo de la concentración de cada patrón y el logaritmo de su correspondiente valor de inhibición. Interpolando en la curva patrón se determinó la concentración de IAW presente en las muestras. Para todos los cálculos se utilizó el programa informático GraphPad Prism versión 3.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

-Validación del método

El proceso de validación del método consistió en el desarrollo del enzoinmunoensayo expuesto previamente en 4 placas multipocillo por dos analistas durante 3 días. Se hizo un estudio previo donde se establecieron los parámetros a tener en cuenta en la validación del método, así como el rango de aceptación de los mismos. Los parámetros objeto de interés fueron:

-Linealidad.

La linealidad entre los patrones se valoró para cada placa multipocillo analizada, en función del coeficiente r^2 del ajuste cuadrático entre el logaritmo de la concentración y el logaritmo del valor de inhibición de cada patrón.

-Exactitud.

Los analistas prepararon de forma independiente cada día, soluciones de proteína sérica patrón en tampón UAB, a varias concentraciones diferentes: 0, 60, 200, 400, 600, 800 y 2000 ng/ml, cuya recuperación se analizó por duplicado en placas distintas con el fin de conocer cuanto difería el resultado del análisis del valor teórico.

-Precisión.

Para estimar el error aleatorio asociado con el método, originado en todas las variables experimentales, se procedió al análisis repetitivo de preparaciones de control positivo, hidrolizado control e hidrolizado problema.

Este diseño nos permitió observar la variabilidad entre días y la reproducibilidad, mediante la comparación de los resultados obtenidos por cada analista.

-Especificidad.

Está directamente relacionada con la especificidad del suero por la proteína usada para activar las placas, y la pureza de dicha proteína. En este caso, el suero fue generado frente al mismo concentrado de proteína usado como patrón en el ensayo y su especificidad quedó previamente establecida por el proveedor del hidrolizado de proteína sérica, Arla Foods, mediante inmunoblot [Pharmacia Phast System Immunoblot (Pharmacia, Uppsala, Suecia)], en el que se mostró amplia reactividad por las distintas fracciones de proteína sérica, y se juzgó como aceptable para asegurar la calidad pretendida en nuestro método.

-Límite de detección, límite de cuantificación y rango.

Estos tres parámetros están determinados por la curva patrón, cuyos límites inferior y superior son 30 y 3000 ng/ml respectivamente, fuera de los cuales no es posible cuantificar con precisión. Los límites y el rango fueron establecidos teniendo en cuenta la concentración esperada para el hidrolizado problema.

-Sensibilidad.

Dentro del rango que cubre el ensayo, cada nanogramo de IAW genera unas unidades de densidad óptica (DO) o absorbancia. La sensibilidad del ensayo se calculó mediante la fórmula:

$$S = \frac{\text{DO media patrón de 30 ng/ml} - \text{DO media patrón de 3000 ng/ml}}{3000 \text{ ng/ml} - 30 \text{ ng/ml}}$$

-Robustez.

La capacidad del método para obviar pequeñas variaciones en las condiciones del análisis se ensayó con la incorporación de factores tales como: la intervención de dos analistas, la realización del experimento tres días distintos y la reconstitución individual de las muestras a diario. La valoración de la robustez se fundamentó en los datos de precisión generados para el control positivo y el hidrolizado control.

- Cuantificación de IAW en hidrolizados de proteínas lácteas

La proteína sérica inmunológicamente activa (IAW) presente en los hidrolizados usados como ingredientes de las dietas para ratas, en los experimentos de evaluación de la calidad nutricional de la proteína, fue cuantificada mediante el método expuesto anteriormente.

Tabla 17: Esquema de las mezclas de preincubación. (Volúmenes de las soluciones expresados en μl).

Tubo	*UAB	Patrón	Control	Muestra	Anticuerpo primario
Blanco	800	-	-	-	-
**Amax	400	-	-	-	400
Patrón	-	400	-	-	400
Control	-	-	400	-	400
Muestras	-	-	-	400	400

*UAB=PBS suplementado con ovoalbúmina al 0.05 % (p/v) y Tween-20 al 0.1 %.

**Amax= Absorbancia máxima.

Placas 1 y 2.

	1											12
A	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
B	Blanco	Amx	STD	STD	STD	STD	STD	STD	C+	C+		
C			3000	1000	600	300	100	30	200	200		
D												
E	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1				
F	100	100	200	200	300	300	MIX	MIX	LHC	LHC		
G												
H												

Placas 3 y 4.

	1											12
A	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
B	Blanco	Amx	STD	STD	STD	STD	STD	STD	C+	C+		
C			3000	1000	600	300	100	30	200	200		
D												
E	STD	STD	STD	STD	STD	STD	STD	STD				
F	2000	800	600	400	200	60	0	0	LHC	LHC		
G												
H												

Fig.10 Distribución en las placas de las muestras de preincubación. (Donde Amx=Absorbancia máxima, STD=patrón, C+=control positivo, L1-100 a L1-MIX= distintas muestras del hidrolizado problema, LHC=hidrolizado control).

2.1.2. ELISA para la cuantificación de caseína inmunológicamente activa.

La determinación de la antigenicidad de los hidrolizados debida a caseína se realizó mediante un ELISA competitivo según el método descrito por Cordle *et al.* (1994), con ligeras modificaciones.

-Metodología:

Se utilizó una solución de caseína intacta con una concentración de 3.26 mg/ml como proteína patrón y otra de concentración 1.15 mg/ml como control positivo. Un hidrolizado de caseína cuya concentración de caseína inmunológicamente activa (IAC) era conocida, fue utilizado como hidrolizado control, a una concentración de 20 mg/ml. Todos ellos fueron suministrados por Ross Laboratorios (Columbus, OH, USA).

Este método se desarrolló en placas multipocillo Immulon 2 (Dynex Technologies), las cuales se activaron mediante la incubación durante 2.5 horas a temperatura ambiente (23.5° C), con 100 µl por pocillo de una solución de proteína sérica patrón, a una concentración de 100 ng/ml en tampón carbonato/bicarbonato. La composición de este tampón, así como la del tampón UAB, son las mismas descritas previamente en el método de ELISA para la cuantificación de proteína sérica inmunológicamente activa.

Tras ser activadas, las placas se lavaron 4 veces con tampón UAB en el lavador para placas multipocillo Bio-Tek Elx405.

A continuación, para minimizar las uniones inespecíficas, las placas fueron incubadas de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente con 200 µl por pocillo de tampón UAB.

Las muestras de hidrolizados (hidrolizado de caseína de DMV, CE90STL, e hidrolizado de proteína sérica baja en lactosa de Arla Foods, Peptigen IF-3002 L-25-10108401) se reconstituyeron a una concentración de 20 mg /ml en tampón UAB y se sometieron a un período de incubación de 15 minutos a 37 °C para su completa disolución. La proteína

patrón se diluyó a seis concentraciones distintas entre 3000 ng/ml y 10 ng/ml para generar la curva patrón, y la proteína control positivo a 100 ng/ml, todo ello en tampón UAB.

El procedimiento implica realizar una mezcla de preincubación, para ello, se tomaron 400 µl de cada dilución de la proteína patrón, del control positivo, del hidrolizado control y de las correspondientes muestras, y se mezclaron con 400 µl de una solución de suero de conejo que contenía el anticuerpo primario específico anticaseína, proporcionado por Ross Laboratories, a una dilución 1:150000 durante 2 horas a 37 °C.

Tras lavar las placas con tampón UAB, se les añadieron 100 µl por pocillo de cada mezcla de preincubación (por triplicado), siguiendo una distribución similar a la mostrada en la figura 10 para las placas 1 y 2, y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Los inmunocomplejos y el anticuerpo en exceso no unidos a las placas fueron eliminados mediante el lavado. Seguidamente se incubaron las placas 1 hora a temperatura ambiente, con 100 µl en cada pocillo de una solución de anticuerpo secundario, suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Biosdesign) diluido 1:10000 en tampón UAB.

Después de lavar de nuevo las placas con tampón UAB, éstas se incubaron durante 10 minutos exactos con 100 µl por pocillo de una solución que contenía el sustrato para el enzima acoplado al anticuerpo secundario. Dicha solución estaba compuesta por una mezcla a partes iguales de TMB (3,3', 5,5' Tetrametilbencidina) y solución B sustrato de peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories). La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de una solución de ácido fosfórico 1 M y se midió absorbancia a 450 nm en el lector de placas multipocillo IEMS Reader Labsystem.

El cálculo de la concentración de caseína inmunológicamente activa (IAC) se realizó siguiendo el mismo procedimiento empleado para obtener la concentración de proteína sérica inmunológicamente activa.

2.2.- In vivo: Medida de la reactividad inmunológica de antígenos administrados oralmente.

Se realizó un estudio de la capacidad inmunizante por vía oral de una fórmula infantil de baja alergenicidad comparada con productos comerciales. La alergenicidad de los productos se evaluó examinando la respuesta anafiláctica a proteínas lácteas, tanto a nivel intestinal como sistémico.

-Animales:

Se utilizaron 25 cobayas macho, Dunkin-Hartley, de aproximadamente 250 g de peso al inicio del estudio, suministrados por Harlan Iberica (Barcelona), que fueron alojados individualmente. Los animales se mantuvieron en una habitación aclimatada a 22 °C con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

-Dietas:

Los animales fueron alimentados con dieta chow para cobayas, carente de proteínas de origen lácteo, suministrada por Harlan Iberica (Barcelona), y recibieron agua “*ad libitum*”. Como variables de la capacidad de promover reactividad inmunológica *in vivo*, se estudiaron leche de vaca y diferentes fórmulas infantiles suministradas por Abbott Laboratorios (Granada): una fórmula comercial de inicio, una fórmula comercial hipoalérgica y la fórmula experimental de baja alergenicidad objeto de estudio. Las tablas 18 a 21 muestran la composición de las dietas.

Tabla 18: Composición de la formula comercial infantil de inicio (grupo 1).

INGREDIENTES		
<p>Leche descremada, lactosa; aceites vegetales: (aceite de girasol rico en ácido oleico, aceite de coco, aceite de soja), concentrado de proteínas de suero lácteo, minerales: (citrato de potasio, carbonato sulfato ferroso, sulfato de zinc, sulfato de cobre, sulfato de manganeso, selenato de sodio), vitaminas: (cloruro de colina, ascorbato de sodio, tocoferoles, niacinamida, pantotenato de calcio, palmitato de vitamina A, clorhidrato de tiamina, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, betacaroteno, ácido fólico, filoquinona, biotina, vitamina D₃, cianocobalamina), nucleotidos: (5' monofosfato de citidina, 5' monofosfato de uridina disódica, 5' monofosfato de guanosina disódica, 5' monofosfato de adenosina) y taurina.</p>		
COMPOSICIÓN QUÍMICA		unidades/100g
Proteína	10.9	g
Hidratos de carbono	55.5	g
Grasa	28.9	g
Ácido linoleico	5257	mg
Ácido linolénico	560	mg
Humedad	2.3	g
Cenizas	2.9	g
Calcio	410	mg
Fósforo	221	mg
Magnesio	32	mg
Sodio	126	mg
Potasio	552	mg
Cloruro	342	mg
Zinc	3.94	mg
Hierro	9.5	mg
Cobre	473	µg
Manganeso	27	µg
Yodo	32	µg
Selenio	12	µg
Vitamina A	1577	UI
Vitamina D	315	UI
Vitamina E	16	UI
Vitamina K1	42	µg
Vitamina C	47	mg
Vitamina B1	526	µg
Vitamina B2	788	µg
Vitamina B6	315	µg
Vitamina B12	1.31	µg
Niacina (equiv.)	5.5	mg
Ácido pantoténico	2365	µg
Ácido fólico	79	µg
Biotina	23	µg
Colina	84	mg
Inositol	24.7	mg
Taurina	35	mg

Tabla 19: Composición de la fórmula comercial infantil hipoalérgica (grupo 2):

INGREDIENTES		
Maltodextrina, aceites vegetales: (aceite de girasol rico en ácido oleico, aceite de coco, aceite de soja, aceite de coco fraccionado), hidrolizado de proteínas de suero lácteo , sacarosa, minerales: (cloruro cálcico, fosfato cálcico dibásico, hidróxido de potasio, sulfato magnésico, fosfato sódico dibásico, lactato ferroso, cloruro potásico, sulfato de zinc, sulfato cúprico, sulfato de manganeso, yoduro potásico y selenito sódico), emulgente: lecitina, vitaminas: (ascorbato sódico, palmitato de ascorbilo, cloruro de colina, vitamina E, mezcla de tocoferoles, niacinamida, vitamina A, pantotenato cálcico, vitamina D3, biotina, vitamina B12, vitamina K1, clorhidrato de tiamina, riboflavina, ácido fólico, clorhidrato de piridoxina y betacaroteno), L-arginina, estabilizante: goma xantica, nucleótidos: (5' monofosfatos de citidina, uridina disódica, guanosina disódica y adenosina), L-fenilalanina, L-histidina, L-tirosina, L-triptofano, taurina y L-carnitina.		
COMPOSICIÓN QUÍMICA		unidades/100g
Proteína	13.25	g
Hidratos de carbono	55.9	g
Grasa	25.35	g
Ácido linoleico	4100	mg
Ácido linolénico	525	mg
Humedad	2.6	g
Cenizas	2.9	g
Calcio	475	mg
Fósforo	250	mg
Magnesio	40	mg
Sodio	207	mg
Potasio	507	mg
Cloruro	371	mg
Zinc	3.3	mg
Hierro	6	mg
Cobre	330	µg
Manganeso	320	µg
Yodo	50	µg
Selenio	10.6	µg
Vitamina A	1455	UI
Vitamina D	6.1	UI
Vitamina E	7	UI
Vitamina K1	50	µg
Vitamina C	56	mg
Vitamina B1	370	µg
Vitamina B2	460	µg
Vitamina B6	250	µg
Vitamina B12	1	µg
Niacina (equiv.)	5.6	mg
Ácido pantoténico	3.6	µg
Ácido fólico	37	µg
Biotina	15	µg
Colina	66	mg
L-carnitina	8.9	mg
Taurina	34	mg

Tabla 20: Composición de la formula infantil experimental hipoalergénica objeto de estudio (grupo 3).

INGREDIENTES		
Maltodextrina, aceites vegetales: (aceite de girasol rico en ácido oleico, aceite de coco, aceite de soja, aceite de coco fraccionado), hidrolizado de proteínas de suero lácteo , sacarosa, hidrolizado de caseína , almidón de maíz modificado, minerales: (fosfato cálcico dibásico, cloruro cálcico, sulfato magnésico, hidróxido de potasio, fosfato sódico dibásico, lactato ferroso, sulfato de zinc, sulfato cúprico, sulfato de manganeso, yoduro potásico y selenito sódico), ester cítrico, vitaminas: (ascorbato sódico, palmitato de ascorbilo, cloruro de colina, vitamina E, mezcla de tocoferoles, niacinamida, vitamina A, pantotenato cálcico, vitamina D3, biotina, vitamina B12, vitamina K1, clorhidrato de tiamina, riboflavina, ácido fólico, clorhidrato de piridoxina y betacaroteno), nucleótidos: (5' monofosfatos de citidina, uridina disódica, guanosina disódica y adenosina), L-arginina, L-triptofano, taurina y L-carnitina.		
COMPOSICIÓN QUÍMICA		unidades/100g
Proteína	13.19	g
Hidratos de carbono	55.82	g
Grasa	25.60	g
Ácido linoleico	4100	mg
Ácido linolénico	525	mg
Humedad	2.52	g
Cenizas	2.87	g
Calcio	508	mg
Fósforo	267	mg
Magnesio	45	mg
Sodio	228	mg
Potasio	535	mg
Cloruro	436	mg
Zinc	3.3	mg
Hierro	8	mg
Cobre	469	µg
Manganeso	395	µg
Yodo	50	µg
Selenio	10.6	µg
Vitamina A	1976	UI
Vitamina D	6.1	UI
Vitamina E	7	UI
Vitamina K1	50	µg
Vitamina C	64	mg
Vitamina B1	370	µg
Vitamina B2	487	µg
Vitamina B6	261	µg
Vitamina B12	1	µg
Niacina (equiv.)	5.6	mg
Ácido pantoténico	3.6	µg
Ácido fólico	37	µg
Biotina	15	µg
Colina	66	mg
L-carnitina	8.9	mg
Taurina	34	mg

Tabla 21: Composición de la dieta chow para cobayas.

INGREDIENTES		
Forrajes, productos y subproductos de granos de cereales, cereales, harina de oleaginosas, productos y subproductos de semillas de oleaginosas, minerales, pre-mezcla de vitaminas y minerales, aceites y grasas.		
COMPOSICIÓN QUÍMICA		unidades
Proteína	19.53	%
Hidratos de carbono	11.70	%
Grasa	3.3	%
Cenizas	8.29	%
Vitamina A	12000	UI/Kg
Vitamina C	3000	mg/Kg
Vitamina D ₃	1400	UI/Kg
Vitamina E	60	UI/Kg

-Diseño experimental y metodología:

Los cobayas fueron alimentados con dieta chow y agua, durante un periodo de adaptación de 5 días. Una vez concluido este periodo se dividieron en 5 grupos de 5 individuos pareados por peso.

En todos los casos los animales recibieron la dieta chow como alimento sólido. El agua de bebida se sustituyó durante 21 días por distintas formulas infantiles, reconstituidas según las especificaciones del fabricante y diluidas con agua 1:2, para facilitar su ingesta. El grupo 1 recibió una formula comercial de inicio, el grupo 2 una formula comercial hipoalergénica y el grupo 3 la formula experimental de baja alergenicidad objeto de estudio. Además, se contó con un grupo control negativo, que recibió agua y un grupo control positivo, que recibió leche de vaca, a las que se añadió vitamina C en cantidad equivalente a la que estaba presente en las formulas. Los animales volvieron a tomar agua 3 días antes de ser sometidos a las pruebas de anafilaxia. La figura 11 muestra un esquema del diseño experimental.

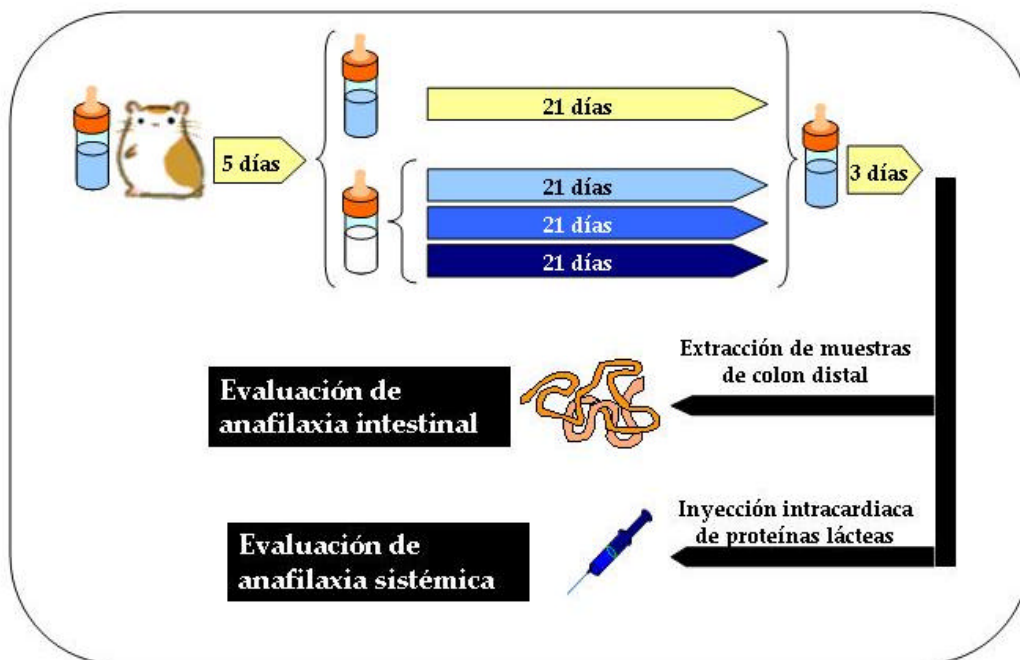


Figura 11: Diseño experimental para la evaluación de la alergenicidad de formulas infantiles.

-Obtención de muestras

Los animales fueron anestesiados mediante la inyección intraperitoneal de una combinación de ketamina, (Imalgéne[®], Laboratorios Merial, Lyon, Francia) y medetomidina, (Domtor[®], Orion Corporation, Espoo, Finlandia) a dosis de 12 mg y 63 µg por cada 100 g de peso del animal, respectivamente. Tras inducir la anestesia, se realizó una incisión abdominal a través de la cual se extrajo una sección de intestino tomada desde el colon distal, de entre 20 y 30 cm de longitud, que fue lavada repetidamente con solución de Krebs a pH 7.4. La composición de dicha solución en milimoles es: 140 Na, 119.8 Cl, 25 HCO₃, 1.2 Ca, 1.2 Mg, 4.8 K, 2.4 HPO₄ y 0.4 H₂PO₄.

-Anafilaxia sistémica

Una vez extraída la muestra de colon, se procedió a evaluar la respuesta de los cobayas frente a la inyección intracardiaca de 470 μg de β -lactoglobulina, disuelta en 100 μl de solución salina isotónica. Para la valoración del grado de respuesta se tuvo en cuenta la siguiente escala:

- Ausencia de reacción = 0
- Dificultad para respirar o enrojecimiento del pabellón auditivo o enrojecimiento de los ojos = 1
- Los 3 síntomas del nivel 1 = 2
- Pérdida de control muscular = 3
- Convulsiones, coma = 4
- Muerte = 5

-Anafilaxia intestinal

La prueba de anafilaxia intestinal se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Kitagawa et al., 1995.

La sección de colon extraída se colocó en un soporte cilíndrico, que se hizo pasar por la luz del fragmento de intestino, para eliminar cuidadosamente la capa de tejido muscular, con ayuda de un hisopo de algodón humedecido en solución de Krebs.

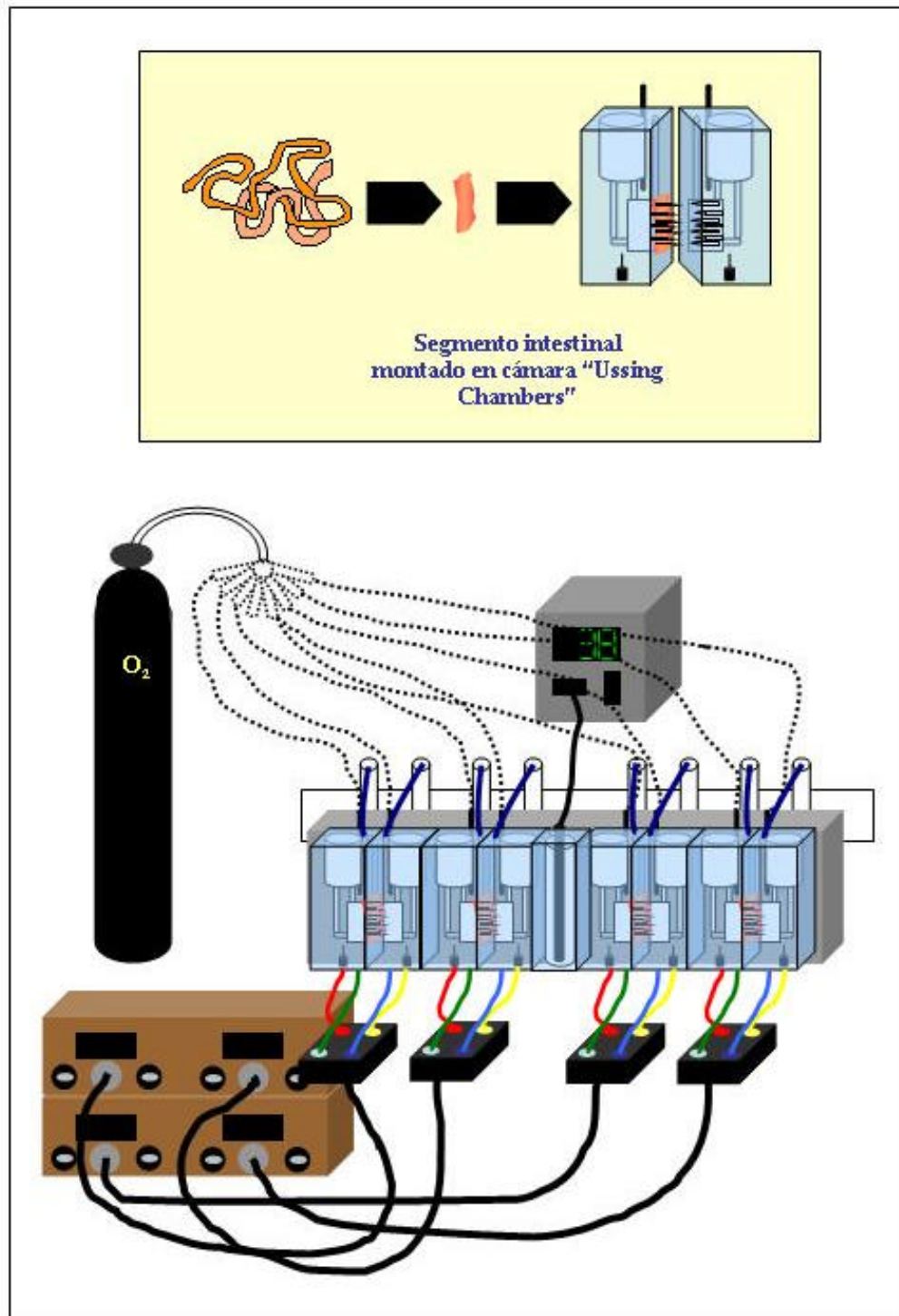
Seguidamente, 4 segmentos del colon, de aproximadamente 1.5 cm de longitud, tomados de distintas zonas, se montaron en las correspondientes cámaras de un sistema Ussing Chambers (TBC, París, Francia), quedando expuesta una superficie tisular de 1 cm^2 . Ambas caras del tejido, serosal y mucosal, se encontraban bañadas en 5 ml de solución de Krebs a 38 °C y con aporte continuo de oxígeno y dióxido de carbono en proporciones 95: 5 (Ver figura 12).

Los valores de diferencia de potencial (ddp) e intensidad (Isc) para cada uno de los fragmentos de tejido, fueron registrados al inicio y tras 30 minutos de estabilización. Los tejidos fueron estimulados con 47 $\mu\text{g/ml}$ de β -lactoglobulina (de Sigma), aplicada en la cara serosal.

La respuesta a la aplicación del antígeno se midió observando la ddp e Isc durante 30 minutos.

Transcurrido este periodo, se añadió histamina a una concentración final de 10^{-4} M en la cara serosal del tejido con el fin de comprobar la viabilidad del mismo.

Figura 12: Esquema de sistema "Ussing Chambers"



3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Experimento 1:

La evaluación de la calidad de las distintas fuentes de proteína estudiadas, se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, teniendo en cuenta grupos y sexo, considerando como significativos valores de $p < 0.05$. Posteriormente las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test de Tuckey. Cuando existieron diferencias entre sexos, los resultados se analizaron empleando una ANOVA de una vía, para cada sexo. Las diferencias entre grupos se obtuvieron a través de comparaciones por parejas mediante el test de Tuckey.

Experimento 2:

La evaluación de la calidad proteica, tanto de los resultados para el coeficiente de eficacia en crecimiento como los de las concentraciones de aminoácidos libres en plasma, hígado y músculo, se analizó mediante una ANOVA de una vía. Valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos. Las comparaciones entre grupos se realizaron de nuevo por el test de Tuckey.

Todo el análisis estadístico se llevo a cabo con el programa estadístico Statgraphics Plus versión 3.0.

Los resultados obtenidos en la validación del método ELISA para la cuantificación de proteína sérica inmunológicamente activa, se evaluaron en función de la desviación estándar relativa o coeficiente de variación, utilizando el programa Microsoft Excel 2000.

Resultados

III. RESULTADOS:

1. EVALUACIÓN NUTRICIONAL

Evaluación de la calidad nutricional de la proteína (Experimento 1)

La tabla 22 muestra los resultados obtenidos para los distintos índices de la calidad nutricional en cada una de las fuentes proteicas estudiadas: caseinato cálcico (dieta 2), mezcla de proteína sérica baja en lactosa y caseinato cálcico (dieta 3) y mezcla de hidrolizado de proteína sérica baja en lactosa e hidrolizado de caseína (dieta 4). Los principales resultados se exponen a continuación:

- ✓ Las mezclas de proteína sérica y caseinato cálcico, tanto intactos como hidrolizados, dieron un valor del coeficiente de digestibilidad verdadera inferior al de la dieta 2.
- ✓ La utilización neta de la proteína en el grupo alimentado con la dieta 4 fue inferior a la obtenida en el grupo alimentado con caseinato.
- ✓ El valor biológico de la proteína fue similar entre grupos en el caso de las hembras. Sin embargo, en el grupo de machos alimentado con la mezcla de hidrolizados el valor de este índice resultó significativamente inferior al de los otros dos grupos.
- ✓ El coeficiente de eficacia en crecimiento para la dieta 4 resultó inferior al del grupo que recibió caseinato cálcico para ambos sexos, y en los machos también inferior al del grupo que tomó la dieta 3.
- ✓ La ingesta proteica fue similar en todos los grupos, aunque el incremento de peso en los machos alimentados con la dieta 4 resultó significativamente inferior al de aquellos alimentados con la dieta 3.

Tabla 22: Ingesta, incremento de peso e índices de utilización metabólica y digestiva obtenidos en ratas alimentadas con dietas con distintas fuentes proteicas.

ÍNDICE	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
CDV	97.55 ± 0.11	94.79 ± 0.38 a	94.27 ± 0.76 a
NPU	86.94 ± 0.99	84.16 ± 0.74	81.18 ± 1.48 a
VB	F 89.45 ± 1.59 M 88.80 ± 1.30	F 87.88 ± 0.65 M 89.68 ± 1.08	F 88.68 ± 1.54 M 83.50 ± 1.36 ab
PER	F 4.11 ± 0.22 M 4.24 ± 0.19	F 3.87 ± 0.10 M 4.33 ± 0.13	F 3.40 ± 0.20 a M 3.65 ± 0.14 ab
Ingesta (g prot./día)	1.28 ± 0.12	1.34 ± 0.18	1.30 ± 0.10
Δ peso (g/día)	F 5.04 ± 0.29 M 5.75 ± 0.43	F 4.89 ± 0.34 M 6.15 ± 0.24	F 4.49 ± 0.34 M 4.68 ± 0.31 b

Fuentes proteicas de cada dieta: **Dieta 2** = caseinato cálcico, **Dieta 3** = proteína sérica y caseinato cálcico, (70:30) y **Dieta 4** = hidrolizado de proteína sérica e hidrolizado de caseína, (70:30). Los resultados están expresados como media ± SEM. **a** vs. Dieta 2 (p<0.05). **b** vs. Dieta 3 (p<0.05). CDV: Coeficiente de digestibilidad verdadera. NPU: Utilización neta proteica. VB: Valor biológico de la proteína. PER: Coeficiente de eficacia en crecimiento. **F**: Grupo de ratas hembra; **M**: Grupo de ratas macho.

Evaluación de la calidad nutricional de la proteína (Experimento 2)

-Cálculo del coeficiente de eficacia en crecimiento

Los resultados obtenidos para el coeficiente de eficacia en crecimiento en ratas alimentadas con dietas basadas en distinta fuente proteica, caseína y proteína sérica, tanto intactas como hidrolizadas, se recogen en la tabla 23.

- ✓ La cantidad de proteína ingerida, el incremento de peso y el coeficiente de eficacia en crecimiento del grupo alimentado con la dieta D (proteína sérica intacta) fueron significativamente superiores a los del grupo de referencia, alimentado con la dieta A (caseína ANRC).
- ✓ El grupo que recibió la dieta E (hidrolizado de proteína sérica) mostró una menor ingesta proteica, menor incremento de peso y menor coeficiente de eficacia en crecimiento que el grupo alimentado con la misma proteína sin hidrolizar (dieta D), aunque estos valores no fueron significativamente distintos de los del grupo de referencia.

Tabla 23: Ingesta, incremento de peso y coeficiente de eficacia en crecimiento observados en ratas alimentadas con dietas con distintas fuentes proteicas.

ÍNDICE	Dieta A	Dieta B	Dieta C	Dieta D	Dieta E
PER	2.73 ± 0.35	3.08 ± 0.30	2.78 ± 0.17	3.66 ± 0.13 a	2.27 ± 0.19 b
PER (% relativo a dieta A)	100	113	102	134 a	83 b
Ingesta (g prot. /día)	0.84 ± 0.08	1.03 ± 0.05	0.90 ± 0.06	1.17 ± 0.06 a	0.72 ± 0.04 b
Δ peso (g /día)	2.25 ± 0.36	2.96 ± 0.37	2.50 ± 0.20	4.15 ± 0.22 a	1.60 ± 0.12 b

Siendo las fuentes proteicas de cada dieta: **Dieta A** = caseína ANRC, **Dieta B** = caseína, **Dieta C** = hidrolizado de caseína, **Dieta D** = proteína sérica y **Dieta E** = hidrolizado de proteína sérica. Los resultados están expresados como media ± SEM. **a** vs. Dieta A (p<0.05). **b** vs. Dieta D (p<0.05). PER: Coeficiente de eficacia en crecimiento.

Las tablas 24, 25 y 26 muestran la concentración de aminoácidos libres encontrada en muestras de plasma, hígado y músculo; algunos aminoácidos no aparecen en concentraciones detectables. Además, estas tablas incluyen la concentración proteica de los homogeneizados de hígado y músculo determinada por el método Bradford, en ratas alimentadas con las distintas dietas objeto de estudio.

-Concentraciones de aminoácidos libres en plasma

La concentración plasmática de cada aminoácido fue comparada, para cada uno de los grupos, con la obtenida en los animales alimentados con la dieta de referencia, la dieta A (caseína ANRC). A su vez, los grupos alimentados con cada una de las proteínas intactas fueron comparados con los que recibieron el correspondiente hidrolizado.

- ✓ Se obtuvieron mayores concentraciones de metionina y taurina plasmáticas en los animales que tomaron las dietas D y E, ambas con proteína sérica como fuente proteica, intacta e hidrolizada, respectivamente.
- ✓ Las ratas alimentadas con la dieta E mostraron en plasma menor concentración de fenilalanina y tirosina que el grupo de referencia. La concentración de tirosina fue también inferior a la mostrada en el grupo alimentado con la dieta D, con la misma fuente de proteínas pero intacta.
- ✓ La concentración de histidina plasmática en el grupo alimentado con la dieta D fue inferior a la de todos los demás grupos.
- ✓ En cuanto a los aminoácidos ácidos, tanto la suma de glutamina y ácido glutámico como la de asparragina y ácido aspártico, resultaron superiores en los animales que tomaron la dieta E que en los alimentados con la dieta de referencia.
- ✓ El grupo que recibió el hidrolizado de caseína, dieta C, mostró una mayor concentración de serina en plasma que el resto de grupos.
- ✓ Todos los grupos mostraron una concentración plasmática de treonina superior a la del grupo de referencia, siendo ésta especialmente elevada en el grupo que

tomó la dieta E. Dicha concentración fue también superior a la del grupo D, que recibió la misma fuente proteica pero intacta.

- ✓ La concentración de hidroxiprolina en el plasma de los animales que tomaron la dieta D fue superior a la de los demás grupos, incluyendo la del que tomó proteína sérica hidrolizada, dieta E.

Tabla 24: Perfil de aminoácidos libres en plasma de ratas alimentadas con dietas cuyas fuentes proteicas eran distintas.

Aminoácido	Dieta A	Dieta B	Dieta C	Dieta D	Dieta E
Aminoácidos neutros					
Ala	2.37 ± 0.20	3.07 ± 0.26	3.56 ± 0.33	3.06 ± 0.18	3.26 ± 0.43
Gly	1.44 ± 0.08	1.53 ± 0.09	1.35 ± 0.06	1.52 ± 0.10	1.28 ± 0.06
Aminoácidos ramificados					
Ile	0.31 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.43 ± 0.05	0.32 ± 0.03	0.43 ± 0.06
Leu	0.36 ± 0.04	0.47 ± 0.04	0.52 ± 0.07	0.38 ± 0.03	0.36 ± 0.07
Val	0.70 ± 0.05	0.85 ± 0.05	0.81 ± 0.07	0.54 ± 0.03	0.63 ± 0.07
Aminoácidos azufrados					
Met	0.13 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.02 a	0.19 ± 0.01 a
Tau	0.23 ± 0.05	0.15 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.59 ± 0.03 a	0.69 ± 0.06 a

Fuentes proteicas de cada dieta: **Dieta A** = caseína ANRC, **Dieta B** = caseína, **Dieta C** = hidrolizado de caseína, **Dieta D** = proteína sérica y **Dieta E** = hidrolizado de proteína sérica. Los resultados están expresados en mM, como media ± SEM. **a** vs. Dieta A (p<0.05). **b** vs. Dieta D (p<0.05).

Tabla 24 (continuación): Perfil de aminoácidos libres en plasma de ratas alimentadas con dietas cuyas fuentes proteicas eran distintas.

Aminoácido	Dieta A	Dieta B	Dieta C	Dieta D	Dieta E
Aminoácidos aromáticos					
Phe	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.06 ± 0.02 a
Trp	0.30 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.40 ± 0.03	0.33 ± 0.04
Tyr	0.33 ± 0.04	0.46 ± 0.05	0.38 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.11 ± 0.03 a b
Aminoácidos básicos					
Arg	0.36 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.31 ± 0.01	0.34 ± 0.04
Cit	0.41 ± 0.04	0.45 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.49 ± 0.02
His	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.4	0.39 ± 0.03	0.06 ± 0.01 a	0.22 ± 0.02 b
Lys	1.61 ± 0.19	1.79 ± 0.15	2.09 ± 0.15	1.80 ± 0.21	2.07 ± 0.34
Orn	0.19 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.007
Aminoácidos ácidos y sus amidas					
Asp	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.07 ± 0.02
Asn	0.41 ± 0.03	0.54 ± 0.04	0.55 ± 0.04	0.51 ± 0.03	0.66 ± 0.08
Glu	0.66 ± 0.11	0.64 ± 0.06	0.76 ± 0.09	0.73 ± 0.06	0.70 ± 0.09
Gln	2.79 ± 0.13	2.96 ± 0.18	2.98 ± 0.09	3.25 ± 0.08	3.67 ± 0.25

Fuentes proteicas de cada dieta: **Dieta A** = caseína ANRC, **Dieta B** = caseína, **Dieta C** = hidrolizado de caseína, **Dieta D** = proteína sérica y **Dieta E** = hidrolizado de proteína sérica. Los resultados están expresados en mM, como media ± SEM. **a** vs. Dieta A (p<0.05). **b** vs. Dieta D (p<0.05).

Tabla 24 (continuación): Perfil de aminoácidos libres en plasma de ratas alimentadas con dietas cuyas fuentes proteicas eran distintas.

Aminoácido	Dieta A	Dieta B	Dieta C	Dieta D	Dieta E
Aminoácidos hidroxilados					
Ser	1.75 ± 0.14	1.97 ± 0.11	2.33 ± 0.13 a	1.57 ± 0.07	1.95 ± 0.17
Thr	1.36 ± 0.09	1.79 ± 0.14 a	2.33 ± 0.14 a	3.91 ± 0.44 a	9.73±1.17 a b
Iminoácidos					
Hypro	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.01 a	0.11± 0.01 b
Pro	1.15 ± 0.17	1.70 ± 0.21	1.64 ± 0.14	0.99 ± 0.07	1.32 ± 0.14

Fuentes proteicas de cada dieta: **Dieta A** = caseína ANRC, **Dieta B** = caseína, **Dieta C** = hidrolizado de caseína, **Dieta D** = proteína sérica y **Dieta E** = hidrolizado de proteína sérica. Los resultados están expresados en mM, como media ± SEM. **a** vs. Dieta A ($p < 0.05$). **b** vs. Dieta D ($p < 0.05$).

-Concentraciones de aminoácidos libres en hígado

La concentración de aminoácidos libres en los homogenizados de hígado fue comparada, para cada uno de los grupos, con la obtenida en los animales alimentados con la dieta de referencia, la dieta A (caseína ANRC). A su vez fueron comparados los grupos alimentados con cada una de las proteínas intactas con los que recibieron el correspondiente hidrolizado.

- ✓ El grupo alimentado con la dieta E, hidrolizado de proteína sérica, mostró una concentración significativamente inferior de glicina tanto con respecto al grupo de referencia como con respecto al grupo alimentado con la dieta D, proteína

sérica intacta. Este mismo grupo, dieta E, presentó mayor concentración de metionina que el grupo de referencia.

- ✓ El grupo alimentado con la dieta D resultó tener mayores concentraciones de taurina y citrulina, y menores de histidina y serina que el grupo de referencia. La concentración de serina en dicho grupo fue también inferior a la del grupo que tomó proteína sérica hidrolizada, dieta E.
- ✓ La concentración de treonina para los animales que tomaron la dieta E fue muy superior a la encontrada en los homogenizados del grupo de referencia.
- ✓ Los dos grupos con proteína sérica como fuente proteica, dietas D y E, presentaron una concentración de fosfoserina superior a la de los grupos que tomaron dietas con caseína.

Tabla 25: Concentración de proteínas y perfil de aminoácidos libres en homogenizados de hígado de ratas alimentadas con dietas cuyas fuentes proteicas eran distintas.

Aminoácido	Dieta A	Dieta B	Dieta C	Dieta D	Dieta E
Proteínas	0.84 ± 0.05	0.74 ± 0.02	0.76 ± 0.03	0.74 ± 0.03	0.76 ± 0.03
Aminoácidos neutros					
Ala	7.64 ± 0.72	9.59 ± 0.56	8.69 ± 0.63	7.51 ± 0.45	7.21 ± 0.70
β-Ala	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.03
Gly	4.52 ± 0.30	5.43 ± 0.30	4.00 ± 0.30	4.37 ± 0.27	3.27±0.18 a b

Fuentes proteicas de cada dieta: **Dieta A** = caseína ANRC, **Dieta B** = caseína, **Dieta C** = hidrolizado de caseína, **Dieta D** = proteína sérica y **Dieta E** = hidrolizado de proteína sérica. Los resultados están expresados en mg/g de tejido fresco, como media ± SEM, para la concentración proteica y en mmol/g de proteína, como media ± SEM, para los distintos aminoácidos. **a** vs. Dieta A (p<0.05). **b** vs. Dieta D (p<0.05).

Tabla 25 (continuación): Concentración de proteínas y perfil de aminoácidos libres en homogenizados de hígado de ratas alimentadas con dietas cuyas fuentes proteicas eran distintas.

Aminoácido	Dieta A	Dieta B	Dieta C	Dieta D	Dieta E
Aminoácidos ramificados					
Ile	1.49 ± 0.17	1.52 ± 0.12	1.60 ± 0.13	1.42 ± 0.13	1.52 ± 0.18
Leu	0.67 ± 0.04	0.71 ± 0.03	0.63 ± 0.03	0.81 ± 0.04	0.67 ± 0.04
Val	0.48 ± 0.05	0.51 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.44 ± 0.03
Aminoácidos azufrados					
Cys	1.46 ± 0.11	1.66 ± 0.11	1.67 ± 0.09	1.8 ± 0.11	1.87 ± 0.09
Met	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.12	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.26 ± 0.04 a
Tau	1.96 ± 0.29	2.45 ± 0.61	1.90 ± 0.27	3.83 ± 0.80 a	3.09 ± 0.37
Aminoácidos aromáticos					
Phe	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.01
Trp	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Tyr	0.30 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.24 ± 0.02
Aminoácidos básicos					
Cit	0.63 ± 0.09	0.90 ± 0.15	0.73 ± 0.10	1.01 ± 0.39 a	0.70 ± 0.11
Orn	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.03

Fuentes proteicas de cada dieta: **Dieta A** = caseína ANRC, **Dieta B** = caseína, **Dieta C** = hidrolizado de caseína, **Dieta D** = proteína sérica y **Dieta E** = hidrolizado de proteína sérica. Los resultados están expresados en mg/g de tejido fresco, como media ± SEM, para la concentración proteica y en mmol/g de proteína, como media ± SEM, para los distintos aminoácidos. **a** vs. Dieta A (p<0.05). **b** vs. Dieta D (p<0.05).

Tabla 25 (continuación): Concentración de proteínas y perfil de aminoácidos libres en homogenizados de hígado de ratas alimentadas con dietas cuyas fuentes proteicas eran distintas.

Aminoácido	Dieta A	Dieta B	Dieta C	Dieta D	Dieta E
Aminoácidos básicos					
His	0.53 ± 0.06	0.60 ± 0.05	0.55 ± 0.04	0.24 ± 0.06 a	0.40 ± 0.04
H-Lys-2	13.95 ± 0.79	15.39 ± 0.49	14.80 ± 0.45	15.38 ± 0.76	14.75 ± 0.56
Lys	0.33 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.41 ± 0.06	0.42 ± 0.05	0.63 ± 0.17
Aminoácidos ácidos y sus amidas					
Asp	1.80 ± 0.35	1.90 ± 0.22	1.55 ± 0.17	1.39 ± 0.14	1.19 ± 0.14
Asn	0.91 ± 0.12	0.97 ± 0.10	0.94 ± 0.08	0.59 ± 0.04	0.76 ± 0.09
Glu	5.24 ± 0.60	5.72 ± 0.43	4.34 ± 0.44	4.09 ± 0.51	3.06 ± 0.32
Gln	7.15 ± 0.69	7.92 ± 0.48	7.56 ± 0.53	10.10 ± 1.04	9.55 ± 0.94
Aminoácidos hidroxilados					
Ser	3.79 ± 0.33	4.06 ± 0.26	4.77 ± 0.20	2.43 ± 0.15 a	4.14 ± 0.47 b
p-Ser	0.27 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.69 ± 0.09 a	0.90 ± 0.13 a
Thr	1.57 ± 0.16	1.81 ± 0.14	2.44 ± 0.16	2.59 ± 0.39	6.43 ± 1.33 a

Fuentes proteicas de cada dieta: **Dieta A** = caseína ANRC, **Dieta B** = caseína, **Dieta C** = hidrolizado de caseína, **Dieta D** = proteína sérica y **Dieta E** = hidrolizado de proteína sérica. Los resultados están expresados en mg/g de tejido fresco, como media ± SEM, para la concentración proteica y en mmol/g de proteína, como media ± SEM, para los distintos aminoácidos. **a** vs. Dieta A (p<0.05). **b** vs. Dieta D (p<0.05).

Tabla 25 (continuación): Concentración de proteínas y perfil de aminoácidos libres en homogenizados de hígado de ratas alimentadas con dietas cuyas fuentes proteicas eran distintas.

Aminoácido	Dieta A	Dieta B	Dieta C	Dieta D	Dieta E
Iminoácidos					
Pro	0.61 ± 0.08	0.84 ± 0.08	0.90 ± 0.08	0.53 ± 0.02	0.71 ± 0.07
Otros					
Pea	1.87 ± 0.46	1.24 ± 0.22	1.82 ± 0.30	1.39 ± 0.14	1.36 ± 0.27

Siendo las fuentes proteicas de cada dieta: **Dieta A** = caseína ANRC, **Dieta B** = caseína, **Dieta C** = hidrolizado de caseína, **Dieta D** = proteína sérica y **Dieta E** = hidrolizado de proteína sérica. Los resultados están expresados en mg/g de tejido fresco, como media ± SEM, para la concentración proteica y en mmol/g de proteína, como media ± SEM, para los distintos aminoácidos. **a** vs. Dieta A ($p < 0.05$). **b** vs. Dieta D ($p < 0.05$). Pea = fosfoetanolamina.

-Concentraciones de aminoácidos libres en músculo

La concentración de aminoácidos libres en los homogenizados de músculo fue comparada, para cada uno de los grupos, con la obtenida en los animales alimentados con la dieta de referencia, la dieta A (caseína ANRC). A su vez, los grupos alimentados con cada una de las proteínas intactas fueron comparados con los que recibieron el correspondiente hidrolizado.

- ✓ Los grupos que recibieron las dietas C, D y E mostraron mayor concentración de metionina que el grupo de referencia. En el grupo que tomó la dieta E, proteína sérica hidrolizada, dicha concentración superó también a la del que tomó la misma fuente proteica pero intacta.

- ✓ Los animales alimentados con proteína sérica, tanto intacta como hidrolizada, dietas D y E, presentaron mayores concentraciones de taurina y menores de tirosina que los que recibieron caseína, incluido el grupo de referencia.
- ✓ El grupo que recibió la dieta D tuvo mayor concentración de citrulina que el grupo de referencia y que el grupo que se alimentó con la dieta E, es decir con la misma fuente de proteína pero hidrolizada.
- ✓ La concentración de lisina en los homogenizados de músculo del grupo que tomó la dieta E fue superior a la del grupo que tomó la dieta A, de referencia, y a la del grupo alimentado con la dieta D.
- ✓ Las ratas alimentadas con la dieta D mostraron una mayor concentración de la suma de ácido glutámico y glutamina que el grupo de referencia.
- ✓ El grupo que recibió el hidrolizado de caseína, dieta C, mostró una concentración de serina superior a la del grupo de referencia. El que recibió el hidrolizado de proteína sérica, dieta E, mostró mayor concentración de serina que el que recibió la misma proteína intacta, dieta D.
- ✓ Los grupos alimentados con las dietas C, D y E, presentaron concentraciones de treonina superiores a la del grupo de referencia, superando en el grupo que tomó la dieta E el valor obtenido para la misma fuente proteica pero intacta, dieta D.
- ✓ La concentración de hidroxiprolina en el grupo alimentado con la dieta D superó la del grupo de referencia y la del grupo alimentado con proteína sérica hidrolizada, dieta E.
- ✓ Los animales alimentados con proteína sérica, tanto intacta como hidrolizada, mostraron concentraciones de carnosina, y de la suma de 1-metilhistidina y anserina inferiores a las obtenidas en los que tomaron caseína, incluido el grupo de referencia.

Tabla 26: Concentración de proteínas y perfil de aminoácidos libres en homogeneizados de músculo de ratas alimentadas con dietas cuyas fuentes proteicas eran distintas.

Aminoácido	Dieta A	Dieta B	Dieta C	Dieta D	Dieta E
Proteínas	0.98 ± 0.03	0.85 ± 0.04	0.99 ± 0.03	0.96 ± 0.04	1.01 ± 0.08
Aminoácidos neutros					
Ala	3.28 ± 0.22	4.03 ± 0.27	4.09 ± 0.36	3.52 ± 0.23	3.67 ± 0.24
Gly	6.29 ± 0.54	7.09 ± 0.63	6.48 ± 0.51	5.85 ± 0.36	4.59 ± 0.34
Aminoácidos ramificados					
Ile	0.96 ± 0.10	1.12 ± 0.10	1.01 ± 0.09	1.05 ± 0.12	1.02 ± 0.07
Aminoácidos azufrados					
Cys	0.35 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.03
Met	0.13 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.01 a	0.27 ± 0.03 a	0.46 ± 0.05 a b
Tau	5.57 ± 0.69	4.60 ± 0.41	4.66 ± 0.32	11.5 ± 0.66 a	10.7 ± 0.91 a
Aminoácidos aromáticos					
Tyr	0.15 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.07 ± 0.01 a	0.05 ± 0.01 a
Aminoácidos básicos					
Cit	0.23 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.33 ± 0.02 a	0.20 ± 0.01 b
Lys	0.87 ± 0.12	0.98 ± 0.14	1.32 ± 0.18	1.09 ± 0.13	1.97 ± 0.30 a b

Fuentes proteicas de cada dieta: **Dieta A** = caseína ANRC, **Dieta B** = caseína, **Dieta C** = hidrolizado de caseína, **Dieta D** = proteína sérica y **Dieta E** = hidrolizado de proteína sérica. Los resultados están expresados en mg/g de tejido fresco, como media ± SEM, para la concentración proteica y en mmol/g de proteína, como media ± SEM, para los distintos aminoácidos. **a** vs. Dieta A (p<0.05). **b** vs. Dieta D (p<0.05).

Tabla 26 (continuación): Concentración de proteínas y perfil de aminoácidos libres en homogeneizados de músculo de ratas alimentadas con dietas cuyas fuentes proteicas eran distintas.

Aminoácido	Dieta A	Dieta B	Dieta C	Dieta D	Dieta E
Aminoácidos ácidos y sus amidas					
Asp	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Asn	0.52 ± 0.03	0.64 ± 0.06	0.68 ± 0.05	0.52 ± 0.04	0.70 ± 0.07
Glu	1.23 ± 0.10	1.52 ± 0.13	1.36 ± 0.09	1.36 ± 0.09	1.36 ± 0.16
Gln	4.85 ± 0.15	5.88 ± 0.38	5.60 ± 0.32	6.85 ± 0.42	6.21 ± 0.45
Aminoácidos hidroxilados					
Ser	2.42 ± 0.15	2.97 ± 0.21	3.29 ± 0.15 a	2.06 ± 0.11	2.68 ± 0.13 b
Thr	1.06 ± 0.07	1.46 ± 0.11	1.70 ± 0.12 a	2.82 ± 0.39 a	5.34 ± 0.53 a b
Iminoácidos					
Hypro	0.15 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.25 ± 0.01 a	0.15 ± 0.03 b
Pro	0.74 ± 0.13	1.05 ± 0.14	0.92 ± 0.09	0.48 ± 0.04	0.71 ± 0.09
Otros					
Carn	0.48 ± 0.05	0.57 ± 0.04	0.46 ± 0.05	0.13 ± 0.03 a	0.15 ± 0.02 a
1M-His+Ans	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.10 ± 0.01 a	0.14 ± 0.02 a

Fuentes proteicas de cada dieta: **Dieta A** = caseína ANRC, **Dieta B** = caseína, **Dieta C** = hidrolizado de caseína, **Dieta D** = proteína sérica y **Dieta E** = hidrolizado de proteína sérica. Los resultados están expresados en mg/g de tejido fresco, como media ± SEM, para la concentración proteica y en mmol/g de proteína, como media ± SEM, para los distintos aminoácidos. **a** vs. Dieta A (p<0.05). **b** vs. Dieta D (p<0.05). Carn= carnosina; 1MHis = 1-metil-histidina; Ans = anserina

-Relaciones entre diversos grupos de aminoácidos

Los resultados obtenidos en el cálculo de varios índices de interés nutricional entre diversos grupos de aminoácidos se muestran en la figura 13.

- ✓ La relación entre aminoácidos no esenciales y esenciales en plasma, hígado y músculo resultó inferior en el grupo alimentado con proteína sérica hidrolizada, dieta E, a la obtenida para el grupo de referencia, así como para el grupo alimentado con proteína sérica intacta, dieta D. En músculo, este grupo, dieta D, presentó también un valor para esta relación inferior al del grupo de referencia.
- ✓ La relación entre los aminoácidos azufrados metionina y cisteína en músculo en los grupos alimentados con las dietas D y E fue superior a la del grupo de referencia, y superior en el grupo que tomó el hidrolizado al que tomó la proteína intacta.
- ✓ Tanto en plasma como en músculo la relación entre alanina y treonina resultó inferior en los grupos alimentados con proteína sérica, intacta o hidrolizada, respecto al grupo de referencia, siendo además inferior en el grupo que tomó el hidrolizado, dieta E, respecto al que recibió la proteína intacta, dieta D.
- ✓ El grupo alimentado con la dieta D mostró valores superiores en plasma para los índices en los que se consideran los aminoácidos de cadena ramificada, con respecto al grupo de referencia.

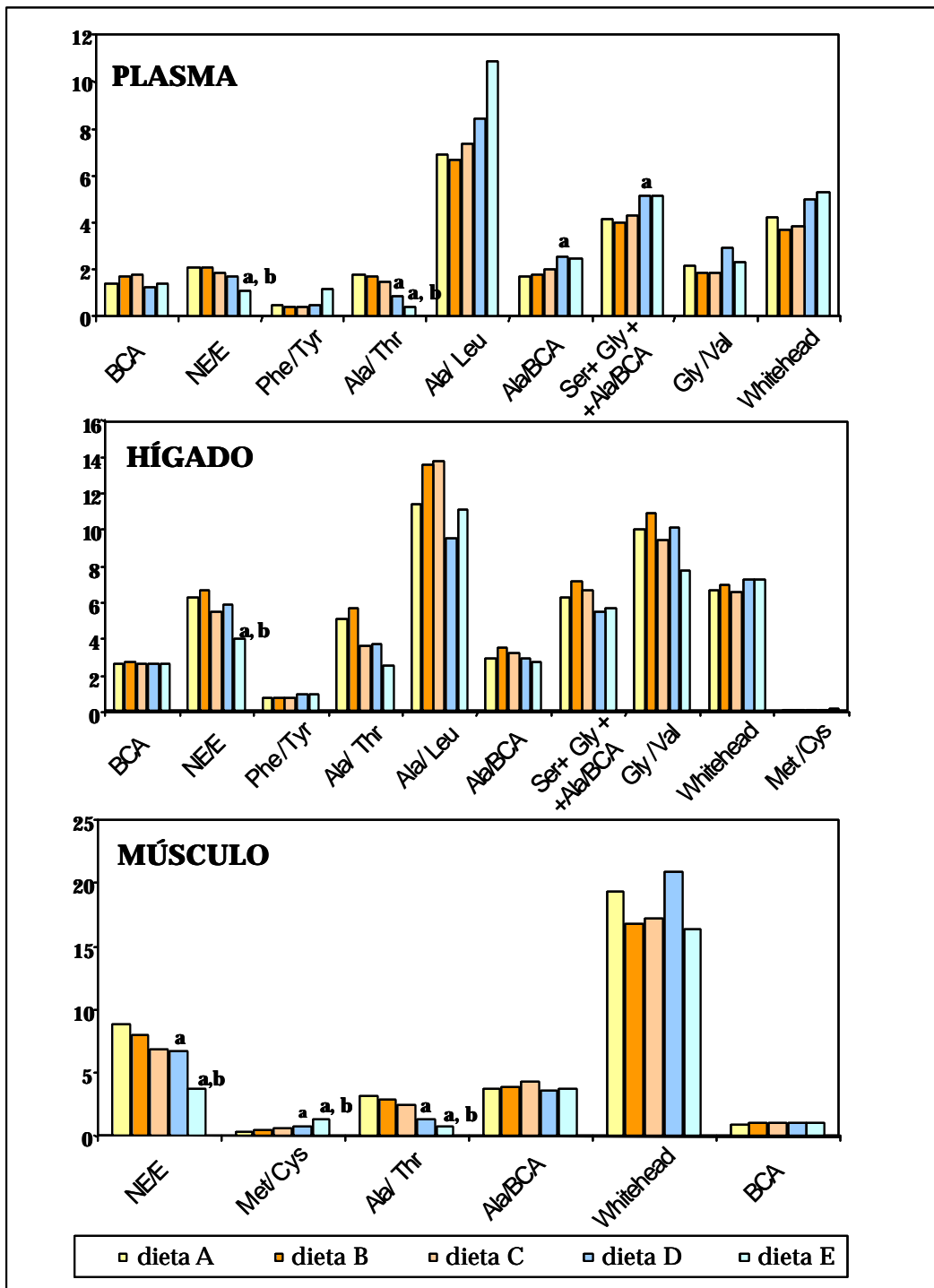


Figura 13: Relaciones entre diversos grupos de aminoácidos en plasma y homogeneizados de hígado y músculo de ratas alimentadas con distintas fuentes proteicas, siendo las fuentes proteicas de cada dieta: **Dieta A** = caseína ANRC, **Dieta B** = caseína, **Dieta C** = hidrolizado de caseína, **Dieta D** = proteína sérica y **Dieta E** = hidrolizado de proteína sérica. **a** vs. Dieta A ($p < 0.05$). **b** vs. Dieta D ($p < 0.05$). E: esenciales. NE: no esenciales. BCA: aminoácidos de cadena ramificada.

2. EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA

2.1. *In vitro*

2.1.1. ELISA para la cuantificación de proteína sérica inmunológicamente activa (IAW).

-Validación del método

-Exactitud

Los datos obtenidos del análisis de muestras de proteína sérica intacta, a concentraciones conocidas, de 60 a 2000 ng/ml, se compararon con los valores esperados. El método mostró una recuperación media del 105 % del valor teórico, con un error estándar del 3 %. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 14.

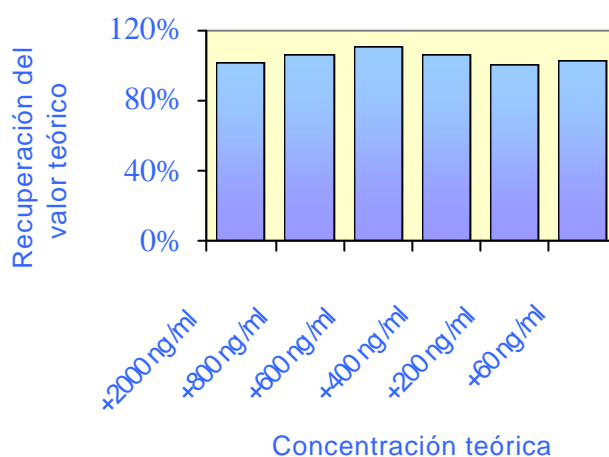


Fig. 14: Representación gráfica de la media del porcentaje de recuperación del valor teórico para cada concentración analizada.

-Precisión

El análisis repetido del control positivo de proteína sérica y del hidrolizado control nos permitió estimar, en función de su coeficiente de variación, la precisión del método. La tabla 27 muestra un resumen de los resultados obtenidos para estas muestras y para el hidrolizado L1.

-Sensibilidad

La sensibilidad de este ensayo fue de 0.00034 unidades de densidad óptica (DO) por ng de IAW y fue calculada a partir de los datos de la tabla 27 aplicando la fórmula:

$$S = \frac{\text{DO media patrón de 30 ng/ml} - \text{DO media patrón de 3000 ng/ml}}{3000 \text{ ng/ml} - 30 \text{ ng/ml}}$$

Tabla 27: Resultados de concentración expresados en ng/ml de IAW obtenidos para el control (+) y las muestras de hidrolizados de proteína sérica.

CONTROL + (200 ng/ml) proteína sérica														
ANALISTA 1				ANALISTA 2										
placa	1	2	3	4	1	2	3	4	Media	σ	CV			
día1	289	256	284	261	341	311	270	263	284	29	10.3			
día2	229	272	238	263	325	311	271	279	274	33	11.9	Media	σ	CV
día3	255	276	252	316	300	284	285	232	275	27	10.0	278	29	10.4
HIDROLIZADO CONTROL (LHC)														
ANALISTA 1				ANALISTA 2										
placa	1	2	3	4	1	2	3	4	Media	σ	CV			
día1	880	844	904	866	1015	1027	877	982	924	72	7.8			
día2	724	901	814	913	1095	973	869	862	894	110	12.3	Media	σ	CV
día3	890	1108	908	1089	989	991	797	861	954	110	11.5	924	98	10.6
HIDROLIZADO (L1)														
ANALISTA 1		ANALISTA 2												
placa	1	2	1	2	Media	σ	CV							
día1	610	617	637	620	621	11	1.8							
día2	520	527	632	588	567	53	9.4	Media	σ	CV				
día3	626	736	643	628	658	52	8.0	615	56	9.0				

IAW= proteína sérica inmunológicamente activa; σ = desviación estándar; CV= coeficiente de variación

Tabla 27: Diferencia entre la densidad óptica (ΔDO) generada por los patrones de menor y mayor concentración (30 – 3000 ng /ml)

placa	ΔDO								Media	σ	CV			
	ANALISTA1				ANALISTA2									
	1	2	3	4	1	2	3	4				Media	σ	CV
día1	1.012	0.981	0.948	1.012	1.078	1.135	1.102	0.977	1.031	0.07	6.5			
día2	0.976	0.933	0.844	0.857	1.085	1.128	1.186	1.211	1.028	0.14	14.1	Media	σ	CV
día3	1.017	0.932	0.985	0.915	1.041	1.001	1.127	1.077	1.012	0.07	7.0	1.023	0.10	9.4
σ = desviación estándar; CV= coeficiente de variación														

-Linealidad

La relación lineal entre la concentración de IAW y la proporción de anticuerpo unido, considerando el coeficiente r^2 del ajuste, se muestra en la tabla 28. El valor medio del coeficiente r^2 para la curva estándar fue de 0.9964 ± 0.0027 . En la figura 15 se observa un ejemplo de la curva patrón generada en cada placa multipocillo.

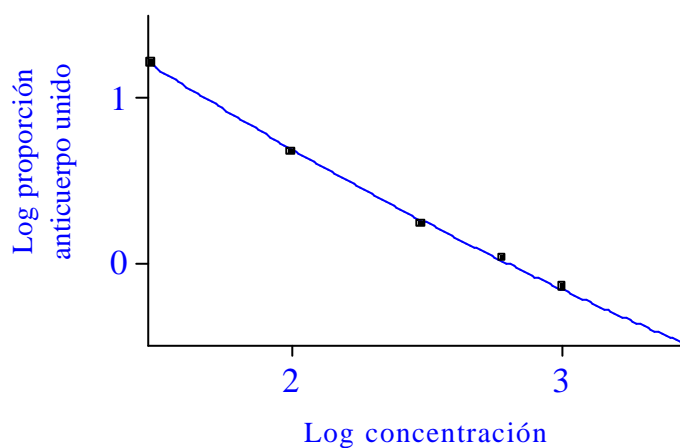
**Fig. 15:** Ejemplo de representación gráfica de la relación lineal entre la concentración de IAW (proteína sérica inmunológicamente activa) y el porcentaje de anticuerpo unido en una placa.

Tabla 28: Valor del coeficiente r^2 para la curva patrón generada en cada placa multipocillo.

LINEALIDAD											
	ANALISTA1				ANALISTA2						
placa	1	2	3	4	1	2	3	4	Media	σ	CV
día1	0.9938	0.9989	0.9983	0.9994	0.9984	0.9887	0.9976	0.9963	0.9964	0.0036	0.4
día2	0.9981	0.9974	0.9947	0.9962	0.9966	0.9966	0.9898	0.9958	0.9957	0.0026	0.3
día3	0.9991	0.9940	0.9986	0.9957	0.9965	0.9994	0.9966	0.9963	0.9970	0.0019	0.2
σ = desviación estándar; CV= coeficiente de variación											

-Robustez

La capacidad del método para que pequeñas variaciones en las condiciones del ensayo no afecten a los resultados se evaluó en función de los resultados de precisión, que mostraron un coeficiente de variación de 10.4 para el control positivo y de 10.6 para el hidrolizado control (Tabla 27).

- Cuantificación de IAW en hidrolizados de proteínas lácteas

Los resultados obtenidos expresados como media \pm SEM fueron: 5.76 ± 0.09 μg de IAW/g de proteína en el hidrolizado de caseína de DMV, CE90STL; y 54.36 ± 1.17 μg de IAW/g de proteína en el hidrolizado de proteína sérica baja en lactosa de Arla Foods, Peptigen IF-3002 L-25-10108401.

2.1.2. ELISA para la cuantificación de caseína inmunológicamente activa (IAC).

Los resultados obtenidos expresados como media \pm SEM fueron: 5.94 ± 0.12 μg de IAC/g de proteína en el hidrolizado de caseína de DMV, CE90STL; y 9.82 ± 0.39 μg de IAC/g de proteína en el hidrolizado de proteína sérica baja en lactosa de Arla Foods, Peptigen IF-3002 L-25-10108401.

2.2. In vivo

Medida de la reactividad inmunológica de antígenos administrados oralmente.

Los resultados obtenidos para incremento de peso no fueron significativamente distintos entre los 5 grupos de cobayas que fueron alimentados con dieta chow para cobayas y según el grupo del que formaban parte: agua, leche de vaca, una formula comercial de inicio, una formula comercial hipoalergénica y la formula experimental de baja alergenicidad objeto de estudio.

-Evaluación de anafilaxia sistémica:

La tabla 29 muestra los criterios y resultados obtenidos en la evaluación de anafilaxia sistémica tras la inyección intracardiaca del antígeno (β -lactoglobulina).

Los valores obtenidos para el grupo 1, que recibió formula comercial infantil de inicio, fueron ligeramente inferiores a los obtenidos para el grupo control positivo, que tomó leche de vaca. No se detectaron diferencias entre los grupos 2 y 3 y el grupo control negativo, a los que se suministraron formula comercial infantil hipoalergénica, la formula experimental objeto de estudio y agua, respectivamente.

-Evaluación de anafilaxia intestinal:

Los resultados para la evaluación de anafilaxia intestinal en función del ΔI_{sc} por grupos tras la adición de β -lactoglobulina se resumen en la figura 16.

Si bien la elevada variabilidad, tanto entre fragmentos del mismo animal, como entre distintos animales, no permitió un análisis estadístico de estos resultados, se observó una clara diferencia entre grupos cinco minutos después de la administración del antígeno.

Los grupos de cobayas que recibieron proteínas lácteas intactas, el grupo 1 (formula comercial infantil de inicio) y el control positivo (leche de vaca), mostraron un valor positivo de Δ Isc. Sin embargo, aquellos que recibieron formulas con proteínas lácteas hidrolizadas, grupo 2 (formula comercial infantil hipoalergénica); grupo 3 (formula experimental hipoalergénica basada en hidrolizados de proteína sérica y caseína), así como el grupo control negativo (agua) mostraron un valor negativo de Δ Isc.

Tabla 29: Criterio de puntuación y resultados de la evaluación de anafilaxia sistémica en cobayas sensibilizados por vía oral.

Síntomas tras la inyección intracardiaca de β -lactoglobulina (50 μ g en 0,1 ml de solución salina)		Puntuación	
NO REACCIÓN		0	
Enrojecimiento de ojos o de orejas o dificultad respiratoria		1	
Los 3 síntomas anteriores juntos		2	
Los síntomas anteriores + perdida de control muscular		3	
Convulsiones		4	
Muerte		5	

Grupo	C-	C+	1	2	3					
Cobaya	1	0	1	5	1	4	1	0	1	0
	2	0	2	5	2	4	2	0	2	0
	3	0	3	5	3	4	3	0	3	0
	4	0	4	5	4	5	4	0	4	0
	5	0	5	5	5	4	5	0	5	0

Grupos: C- = control negativo (agua); C+ = control positivo (leche de vaca); 1 = formula comercial infantil de inicio; 2 = formula comercial infantil hipoalergénica; 3 = formula experimental hipoalergénica objeto de estudio.

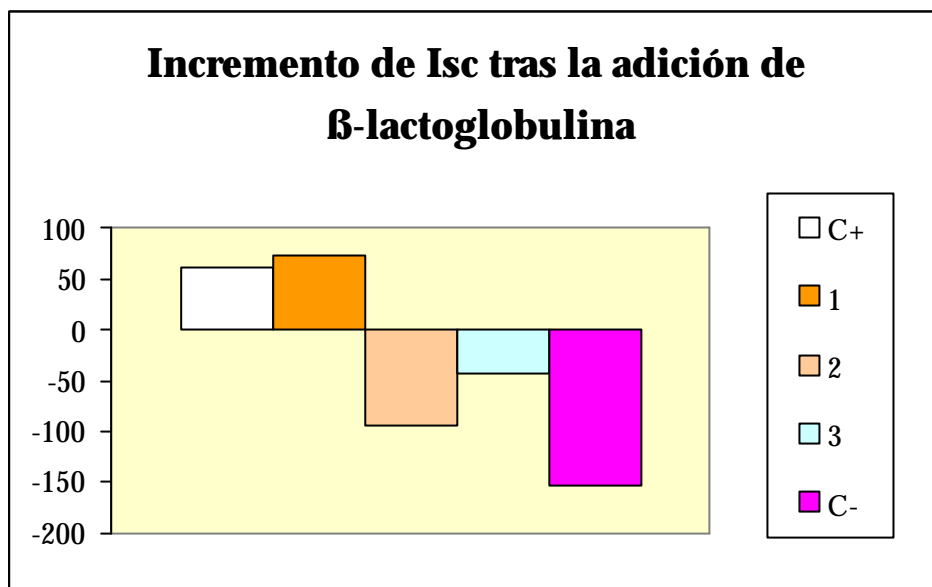


Figura 16: Resultados de la evaluación de anafilaxia intestinal en los distintos grupos de cobayas sensibilizados por vía oral, mediante cuantificación del Δ Isc en un sistema “Ussing Chambers”. C- = control negativo (agua); C+ = control positivo (leche de vaca); 1 = fórmula comercial infantil de inicio; 2 = fórmula comercial infantil hipoalérgica; 3 = fórmula experimental hipoalérgica objeto de estudio.

Discusión

DISCUSIÓN:

Para una mejor discusión de los resultados obtenidos, esta sección ha sido estructurada en cuatro apartados:

- 1.-Evaluación de la calidad nutricional de los hidrolizados de proteínas lácteas.
- 2.-Efectos de la fuente proteica sobre el metabolismo de aminoácidos.
- 3.-Evaluación *in vitro* de la antigenicidad de los hidrolizados de proteínas lácteas.
- 4.-Evaluación *in vivo* de la alergenicidad de la fórmula hipoalergénica experimental.

Los hallazgos fundamentales observados en la evaluación nutricional e inmunológica de la mezcla de hidrolizados de proteína sérica y caseína objeto de este estudio han sido, desde el punto de vista nutricional, la observación de un coeficiente de eficacia en crecimiento menor que el de la caseína de referencia, siendo el componente del hidrolizado de proteína sérica el responsable de dicho descenso en la calidad nutricional. Del perfil de aminoácidos libres en plasma, hígado y músculo en los animales alimentados con las distintas fuentes proteicas, cabe destacar una mayor concentración de aminoácidos azufrados y de treonina en los grupos alimentados con proteína sérica, especialmente en forma hidrolizada.

En la evaluación inmunológica *in vitro*, el método de ELISA competitivo desarrollado para la cuantificación de proteína sérica inmunológicamente activa resultó válido para asegurar el carácter hipoantigénico de hidrolizados de proteína sérica. Por otro lado, la evaluación *in vivo* de la reactividad inmunológica en cobayas mediante la inducción de anafilaxia sistémica de la fórmula experimental de baja alergenicidad dio resultados similares a los obtenidos para la fórmula hipoalergénica comercial.

A continuación se tratan los resultados particulares de cada uno de los apartados en que hemos dividido la discusión.

1.-Evaluación de la calidad nutricional de los hidrolizados de proteínas lácteas.

Las fórmulas infantiles basadas en hidrolizados lácteos de alergenicidad reducida, han sido utilizadas en el tratamiento de alergias e intolerancias alimentarias y más recientemente en la prevención de enfermedad atópica en niños con alto riesgo de desarrollar dicha enfermedad. Desde el punto de vista de composición se distinguen dos tipos fundamentales de hidrolizados de proteínas lácteas: de caseína y de proteína sérica cuyo grado de hidrólisis puede variar.

Diversos estudios clínicos han mostrado que no existen diferencias de crecimiento entre niños alimentados con hidrolizados lácteos y niños alimentados con otras fórmulas o leche materna (Vandenplas *et al.*, 1993; Giovannini *et al.*, 1994; Rigo *et al.*, 1994 (a); Isoulari *et al.*, 1995; Decsi *et al.*, 1996; Exl *et al.*, 1998; Hernell y Lonnerdal, 2003). No obstante, resulta evidente la necesidad de evaluar, previamente a los estudios clínicos, la adecuación nutricional de nuevas fuentes proteicas. Esta evaluación previa se realiza usualmente mediante bioensayos en ratas en crecimiento.

Una serie de estudios realizados por nuestro grupo de investigación a mediados de los años 90 evaluaron el valor nutricional de hidrolizados de proteínas lácteas, tanto de caseína como de proteína sérica, frente a las mismas fuentes proteicas sin hidrolizar (Baró *et al.*, 1995; Boza *et al.*, 1995 (a); Boza *et al.*, 1996). Se evaluó la influencia de las proteínas lácteas (caseína o proteína sérica), intactas o hidrolizadas, en la recuperación de ratas sometidas a ayuno sin encontrar diferencias en ingesta, incremento de peso o digestibilidad de las proteínas. Sí se observaron diferencias en la retención de nitrógeno cuando el periodo de realimentación fue solo de dos días (Boza *et al.*, 1995a), pero estas diferencias no aparecieron cuando el periodo de realimentación duró cuatro días (Boza *et al.*, 1996).

Asimismo, nuestro grupo realizó un estudio de la calidad proteica en ambas fuentes proteicas intactas e hidrolizadas de 7 días de duración (Baró *et al.*, 1995) en el que de nuevo no se detectaron diferencias significativas en ingesta o incremento de peso.

La aplicación de la técnica de Thomas-Mitchell (Mitchell, 1923) para la obtención de los valores de digestibilidad verdadera, utilización neta proteica, valor biológico de la proteína y coeficiente de eficacia en crecimiento (Boza *et al.*, 1994), no dio lugar a diferencias en digestibilidad de la proteína entre proteína sérica y caseína, ni entre sus respectivos hidrolizados. El hidrolizado de proteína sérica mostró en este estudio una mayor utilización de la proteína y mayor valor biológico que la misma fuente proteica intacta. Sin embargo, se observó el efecto contrario en el hidrolizado de caseína respecto a su proteína intacta, aunque la diferencia no llegó a ser significativa. El coeficiente de eficacia en crecimiento resultó inferior para los grupos alimentados con caseína intacta e hidrolizada, respecto a la caseína de referencia (caseína +5% de metionina).

La evaluación posterior mediante la misma técnica de un hidrolizado de proteína sérica frente a la misma caseína de referencia ofreció valores comparables entre ambas fuentes proteicas para todos los parámetros excepto para el coeficiente de eficacia en crecimiento, que fue inferior para el grupo alimentado con el hidrolizado. Se sugirió que esta diferencia puede ser causada por un contenido de proteína en esta dieta ligeramente inferior (Boza *et al.*, 1995b).

En nuestro caso, la valoración de la calidad nutricional de una mezcla de hidrolizados de caseína y de proteína sérica, así como de la mezcla de ambas proteínas intactas, y de caseína intacta por separado, se realizó en función de los valores obtenidos mediante la técnica de Thomas-Mitchell para los siguientes índices: digestibilidad, utilización neta de la proteína, valor biológico y coeficiente de eficacia en crecimiento. Nuestros resultados mostraron, para ingestas proteicas similares, un menor índice de digestibilidad de la mezcla de proteína sérica con caseína (70:30), tanto intacta como hidrolizada, con respecto a la caseína de referencia. Esto no concuerda con los resultados de los estudios previos de nuestro grupo para ambas proteínas por separado y sus respectivos hidrolizados. Estas diferencias podrían explicarse por la mayor resistencia a la digestión de las proteínas que componen el suero lácteo (Baró *et al.*; 1995), y por la diferencia en el grado de hidrólisis del hidrolizado de proteína sérica incluido en nuestro estudio (26%) con respecto a los incluidos en los estudios previos usando la misma técnica donde el hidrolizado solo

contenía un 8.3% de proteína no hidrolizada (Boza *et al.*, 1994), y un 7.42% del hidrolizado tenía un peso molecular superior a 1000Da pero inferior a 3000Da (Boza *et al.*, 1995b). El menor grado de hidrólisis de nuestra fuente de proteína sérica hidrolizada implicaría mayor dificultad para su digestión y absorción a nivel intestinal, teniendo un comportamiento similar al de la proteína sérica intacta. Si bien en el estudio de 1994 mencionado anteriormente la proteína sérica intacta no mostró diferencias en digestibilidad respecto a la caseína, la diferencia con nuestro estudio podría supuestamente deberse a diferencias en el tratamiento tecnológico para la obtención de dicha proteína sérica. El mismo razonamiento explicaría porqué nuestra mezcla de ambas proteínas hidrolizadas (proteína sérica y caseína) dio lugar a una menor utilización neta proteica y menor coeficiente de eficacia en crecimiento que la caseína. Los resultados fueron también algo inferiores para la mezcla de proteínas intactas, aunque no llegaron a ser significativamente distintos de los índices obtenidos para la caseína, lo cual parece indicar, a diferencia de lo descrito previamente en otros estudios, que el proceso tecnológico de hidrólisis afecta a la calidad de la proteína.

Los trabajos mencionados previamente se llevaron a cabo con ratas macho,. En nuestra primera evaluación de la calidad proteica los grupos incluyeron individuos de ambos sexos. Se observó una influencia de este factor para la retención y absorción de nitrógeno (valor biológico de la proteína) que resultó menor en los machos del grupo alimentado con la mezcla de hidrolizados, tanto respecto al grupo que recibió la caseína como al que fue alimentado con la mezcla de proteínas intactas. El incremento de peso fue mayor en los machos de los 3 grupos, y significativamente menor en los machos que recibieron la mezcla de hidrolizados, respecto a los que recibieron la mezcla de proteínas intactas. La influencia del sexo de los animales en la evaluación de la calidad de la proteína es conocida desde hace mucho tiempo (Hurt *et al.*, 1975), pero en esta ocasión consideramos pertinente evaluar nuestras fuentes de proteína de baja alergenicidad en ambos sexos, para obtener la máxima información posible.

El coeficiente de eficacia en crecimiento resultó, en ambos sexos, significativamente inferior para el grupo alimentado con la mezcla de hidrolizados con respecto al alimentado con caseína, y en machos, también respecto al alimentado con la mezcla de proteínas intactas. Esto de nuevo parece indicar un efecto de la hidrólisis sobre la calidad proteica, y de nuevo discrepa de los resultados de estudios anteriores.

El siguiente paso en la evaluación de la calidad de nuestros hidrolizados de proteína sérica y caseína fue la realización de un estudio de la eficacia en crecimiento de ambos hidrolizados por separado, para así descomponer los resultados del estudio previo en sus posibles componentes. Los hidrolizados fueron estudiados respecto a sus proteínas de origen intactas y respecto a una referencia aceptada internacionalmente, caseína ANRC, mediante el método PER (Protein Efficiency Ratio), método 960.48 de la AOAC, que es considerado adecuado por la FDA para la evaluación de la calidad de la proteína (Hurt *et al*, 1975), así como por la Norma del Codex para fórmulas infantiles (CODEX STAN 72, 1981). El método PER ha sido comparado con otros métodos para estimar la calidad proteica; considerando los requerimientos de aminoácidos y el perfil de aminoácidos corregido por la digestibilidad de la proteína, fue propuesto como método de rutina para la evaluación de la calidad proteica (Sarwar y McDonough, 1990). Posteriormente este método fue juzgado inapropiado por sobreestimar la calidad de fuentes proteicas que pudieran contener de manera natural factores depresores del crecimiento o factores antinutricionales formados durante los procesos tecnológicos de obtención de dichas fuentes proteicas por tratamientos alcalinos o térmicos (Sarwar, 1997). La AAP considera necesario asegurar que la proteína suministrada a los niños alérgicos a los alimentos proporcione la cantidad adecuada de aminoácidos esenciales (Modifi, 2003). Recientemente la ESPGHAN, en cuanto al contenido proteico en fórmulas infantiles basadas en hidrolizados, ha recomendado que la fuente proteica hidrolizada tenga un perfil de aminoácidos esenciales comparable al de la leche humana (Koletzko *et al*, 2005). Nuestros hidrolizados, y aún más la mezcla de ambos en proporciones 70:30, se aproximan bastante a dicho perfil, como puede verse en las figuras 6, 7 y 8 incluidas en la sección de Material y Métodos. La evaluación se llevó a cabo en ratas macho, con lo que

eliminamos el factor del sexo y durante 28 días, un periodo más amplio de estudio, al final del cual debe ser más fácilmente detectable una deficiencia en la nutrición proteica causada por una proteína de calidad inferior a la referencia. El grupo alimentado con proteína sérica intacta tuvo una mayor ingesta proteica, un mayor incremento de peso y un mayor coeficiente de eficacia en crecimiento que el alimentado con la caseína de referencia. Sin embargo, se obtuvo el resultado inverso para el grupo que recibió el hidrolizado de proteína sérica, con lo que parecía confirmarse un efecto de la hidrólisis sobre la proteína sérica y su utilización por parte de ratas en crecimiento. No obstante, los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los dos hidrolizados (caseína y proteína sérica) difería en calidad con la proteína de referencia, caseína ANRC.

En resumen, las diferencias observadas entre distintos estudios confirman la necesidad de evaluar individualmente cada nueva fuente proteica. Los hidrolizados objeto de este estudio tienen un perfil de aminoácidos adecuado al compararlos con la leche materna y una calidad comparable a la de la caseína reconocida como referencia en el método PER, aunque el menor coeficiente de eficacia en crecimiento para el hidrolizado de proteína sérica respecto a la misma proteína intacta, junto con la menor utilización neta proteica de la mezcla de hidrolizados de caseína y proteína sérica observada en el primer ensayo, sugieren una utilización distinta de la proteína cuando está hidrolizada, al menos en el caso de la proteína sérica.

2.-Efectos de la fuente proteica sobre el metabolismo de aminoácidos.

Se han llevado a cabo estudios que comparan la adecuación de fórmulas lácteas con diferentes relaciones de proteína sérica y caseína, con respecto a la leche materna a través del perfil plasmático de aminoácidos, entre otros parámetros. La mayoría de estos trabajos

encuentran diferencias destacables sólo en el caso de algunos aminoácidos. Generalmente la concentración de taurina es más alta en el plasma de niños alimentados con leche materna (Janas *et al.*, 1987; Giovannini *et al.*, 1994) y aquellos estudios que incluyen fórmulas basadas en hidrolizados de proteína sérica detectan valores elevados de treonina, metionina y/o citrulina, y disminuidos de prolina (Giovannini *et al.*, 1994; Rigo *et al.*, 1994 (b); Hernell y Lonnerdal, 2003). Una fórmula basada en proteína sérica libre de glicomacropéptido mostró una reducción significativa de la treonina en plasma de niños prematuros frente a una fórmula basada en proteína sérica convencional (Rigo *et al.*, 2001). Las fórmulas basadas en hidrolizado de caseína llevaron en un estudio a concentraciones más bajas de tirosina en plasma, respecto a la alimentación con leche materna (Hernell y Lonnerdal, 2003).

El efecto de variaciones en la cantidad y calidad de la proteína ingerida, así como de nuevas fuentes de proteína o modificaciones en el proceso de obtención de estas sobre el metabolismo de los aminoácidos viene siendo estudiado a través del perfil de aminoácidos en plasma o tejidos en ratas en crecimiento desde los años 70 hasta hoy (Pantako *et al.*, 2001; Nguema *et al.*, 2004; Petzke *et al.*, 2005), siendo la caseína usualmente la referencia como fuente proteica en estos estudios.

En un estudio reciente sobre el descenso de la calidad nutricional de β -lactoglobulina como consecuencia de su reacción con ácido clorogénico (compuesto fenólico) a distintos niveles, se obtuvo menor concentración en plasma de metionina, cisteína, lisina y triptófano para la dieta que fue sometida al tratamiento más severo, lo cual se asoció a una menor digestibilidad verdadera. Aunque no observaron diferencias en la utilización neta proteica entre los grupos cuya dieta sufrió el tratamiento, todos ellos dieron valores inferiores respecto a β -lactoglobulina no tratada y a la caseína +0.3 % de metionina usada como referencia (Petzke *et al.*, 2005). En los trabajos de nuestro grupo sobre el efecto de la hidrólisis de la fuente proteica en la recuperación de ratas sometidas a ayuno (Boza *et al.*, 1995) y sobre el mismo efecto en ratas en crecimiento (Baró *et al.*, 1995), las diferencias en el perfil de aminoácidos plasmáticos entre los distintos grupos fueron asociadas a la

composición de aminoácidos de la proteína (caseína o proteína sérica) sin que se observaran efectos importantes de la hidrólisis de la mismas. En el primer caso, los animales alimentados con proteína sérica mostraron concentraciones superiores de treonina, isoleucina, ácido aspártico y glutámico, y menores de glutamina, prolina y tirosina. El hidrolizado de proteína sérica provocó valores elevados de treonina respecto a la misma proteína intacta, y el de caseína de citrulina y arginina respecto a la misma proteína sin hidrolizar. En el segundo caso, las concentraciones de treonina y taurina, en los grupos alimentados con dietas basadas en proteína sérica resultaron superiores, y las de valina, leucina, histidina y glicina inferiores respecto a los grupos alimentados con caseína.

En nuestro estudio cuantificamos la concentración de aminoácidos libres en plasma, hígado y músculo de los grupos alimentados durante 28 días con dietas con distinta fuente proteica: caseína, proteína sérica, sus respectivos hidrolizados y la caseína ANRC. Nuestros resultados mostraron diferencias atribuibles al tipo de proteína, pero también observamos algunas diferencias entre las fuentes de proteína intactas y sus hidrolizados. Una diferencia importante de nuestro estudio con respecto a los referenciados previamente es la duración; nuestros animales recibieron la misma dieta como único alimento durante 28 días.

Los valores elevados en plasma de metionina y taurina en los animales alimentados con proteína sérica (intacta o hidrolizada) podrían estar causados por la elevada concentración de cisteína de las dietas, como podemos ver en la tabla 16, incluida en la sección de Material y Métodos. La concentración más alta de taurina cuando se administra una dieta basada en proteína sérica coincide con lo descrito en trabajos anteriores, no así la de metionina. La cisteína, precursora de la taurina, sería responsable de su elevada concentración. A su vez podría ser la responsable también de los niveles elevados de metionina; aunque la concentración de este aminoácido es menor en la proteína sérica que en la caseína. La concentración elevada de uno de los productos del metabolismo de la metionina (la cisteína, la taurina o algún otro intermediario) podría ejercer una

regulación negativa sobre la degradación de esta. O bien, como sucede en humanos y hemos comentado previamente en el apartado de antecedentes bibliográficos, podrían mantenerse aún bajas en la rata las actividades de las enzimas responsables de la degradación de la metionina; la cistationasa, la cistationina- β -sintasa y la metionina-adenosil transferasa, tienen reducida su actividad en el hígado del lactante (ESPGAN, 1977; Rassin, 2003). Siendo la cisteína un aminoácido esencial para el lactante, la mezcla de ambas fuentes proteicas, caseína y proteína sérica tiene la ventaja respecto a las fuentes aisladas de proporcionar este aminoácido en una proporción más cercana a la de la leche humana (71%).

Los niveles elevados de metionina podrían estar afectando a su vez a las concentraciones de otros aminoácidos. En un estudio en pollos de Fernández-Figares y colaboradores (1997) la adición de metionina a una dieta base tuvo como consecuencia un incremento en las concentraciones plasmáticas de hidroxiprolina, tirosina, cistina, ácido glutámico y glutamina y un descenso en las de lisina, treonina, ornitina y anserina. Nuestras dietas difieren en composición en más de un aminoácido, pero encontramos que las mismas dietas que producen un nivel elevado de metionina (proteína sérica intacta e hidrolizada) dan lugar también a concentraciones más altas de ácido glutámico y glutamina. Además, la dieta basada en proteína sérica intacta origina una mayor concentración de hidroxiprolina, siendo esta dieta la que menos prolina aporta, y aunque no llega a ser significativamente distinta, las dietas basadas en proteína sérica tanto intacta como hidrolizada dan lugar a una menor concentración plasmática de ornitina.

El hidrolizado de proteína sérica era la fuente proteica con menor contenido en fenilalanina y tirosina, lo que se reflejó fielmente en la concentración de estos aminoácidos en plasma. El grupo alimentado con él mostró valores inferiores al grupo que recibió la caseína de referencia, y en el caso de la tirosina también inferiores a los que recibieron proteína sérica intacta. Este es uno de los casos en que nuestros resultados muestran un efecto de la hidrólisis sobre la calidad de la proteína.

La proteína sérica intacta e hidrolizada contiene según la tabla 16 menor concentración de histidina que la caseína, lo que coincide con la menor concentración plasmática encontrada por Baró y colaboradores en 1995. Nosotros hemos encontrado ese valor disminuido para la proteína sérica intacta, pero no así para el grupo que recibió el hidrolizado, que tuvo una concentración muy similar a la del grupo que recibió la caseína de referencia. Estos resultados sugieren una utilización distinta de la misma fuente proteica en función de que se administre intacta o hidrolizada.

El hidrolizado de proteína sérica produjo valores más altos en plasma de la suma de aspártico más asparragina y de glutámico más glutamina que el grupo de referencia. Los valores del grupo que recibió la fuente de proteína intacta fueron similares pero no llegaron a ser significativamente distintos del grupo de referencia, lo que coincide con los datos de Boza y colaboradores para aspártico y glutámico, pero difiere para la glutamina. Baró y colaboradores (1995) no encontraron diferencias para estos aminoácidos en ratas en crecimiento. Como hemos mencionado previamente, y de acuerdo a los resultados de Fernández-Fígares y colaboradores (1997), la concentración de ácido glutámico y glutamina podría ser una consecuencia de la alta concentración de metionina.

El grupo alimentado con el hidrolizado de caseína mostró una mayor concentración de serina en plasma que la caseína de referencia y la caseína intacta, sin que se puedan explicar estas diferencias por el contenido de este aminoácido en las dietas o lo descrito en estudios similares.

La hipertreoninemia asociada a la ingesta de hidrolizados de proteína sérica ha sido descrita en numerosos estudios tanto en animales como en estudios clínicos (Rigo *et al.*, 1994 (b); Baró *et al.*, 1995; Polberger *et al.*, 1999). Aunque todos los grupos en nuestro estudio tuvieron concentraciones de treonina en plasma superiores a las del grupo de referencia, lo que de nuevo constituye un reflejo de las concentraciones en las dietas, esta concentración fue muy superior en el caso del hidrolizado de proteína sérica. El efecto de altas ingestas de treonina en ratas en crecimiento mostró correlación positiva entre la

treonina ingerida y la concentración de ésta en plasma y cerebro, así como con la concentración en cerebro de glicina, producto este aminoácido del metabolismo de la treonina (Boehm *et al.*, 1998). En nuestros resultados la glicina en plasma no mostró diferencias entre grupos. Una elevada concentración de aminoácidos libres en plasma puede causar una reducción en la ingesta para tratar de recuperar el equilibrio. En el grupo que recibió el hidrolizado de proteína sérica, la ingesta media fue inferior al resto de grupos aunque solo llegó a ser significativamente distinta de la del grupo que tomó proteína sérica intacta.

Existen numerosos estudios del efecto de la suplementación de aminoácidos concretos en diferentes situaciones patológicas sobre el metabolismo de aminoácidos en hígado y músculo en modelos animales.

Varios autores han descrito una asociación entre la adición de lisina a dietas base y el aumento de lisina libre en hígado en pollo y cerdo (Richardson *et al.*, 1965; Jacobs y Crandall, 1972; Edmonds y Baker, 1987, Fernandez-Figares, 1995). Este aumento es paralelo al de otros aminoácidos como triptófano, prolina y anserina y a una disminución de arginina, ornitina, tirosina, fosfoserina, taurina, los aminoácidos ácidos y sus amidas.

La adición de metionina a dietas base produjo en pollos un incremento de histidina, glicina, hidroxiprolina, taurina, ácido glutámico, anserina y creatinina, y una reducción de arginina, valina, metionina, prolina, tirosina, fosfoserina, aspártico y asparragina y ornitina (Fernández-Figares *et al.*, 1997). En nuestro caso las dietas difieren en más de un aminoácido como se ha mencionado previamente, lo que complica la interpretación de los resultados.

El grupo alimentado con el hidrolizado de proteína sérica mostró una concentración inferior de glicina libre en hígado con respecto al grupo de referencia y al que recibió proteína sérica intacta, diferencias no explicables por la composición de las dietas.

La glicina en hígado es transformada a serina. La concentración de este aminoácido tuvo valores inferiores a los del grupo de referencia y a los del que recibió la misma proteína

hidrolizada, teniendo sin embargo una mayor cantidad de glicina libre disponible en la dieta, lo que, como en plasma, podría sugerir una utilización distinta de las proteína según estén intactas o hidrolizadas. El grupo alimentado con el hidrolizado de proteína sérica presentó también en hígado una concentración muy elevada de treonina, indicando que el metabolismo de este aminoácido se encuentra claramente limitado. La glicina, que se obtiene en una de las vías de degradación de la treonina, se encuentra sin embargo disminuida en este grupo, lo que podría deberse a que las otras rutas de degradación tengan más importancia relativa. La concentración de metionina es también superior en este grupo, como ocurrió en plasma. El grupo que recibió la dieta con proteína sérica intacta mostró elevados los valores de taurina y los dos grupos que recibieron proteína sérica como fuente proteica mostraron valores más altos en hígado de fosfoserina que los que recibieron las caseínas. Todas estas diferencias parecen causadas por la composición de aminoácidos de las dietas.

Paralelamente, la adición de lisina a dietas base también se ha asociado a un aumento de su concentración en músculo en pollo (Pion, 1973; Larbier y Guillaume, 1972; Fernández-Fígares *et al.*, 1997), en cerdo (Edmonds y Baker, 1987) y en rata (Jacobs y Crandall, 1972). La suplementación con lisina en el estudio de Fernández-Fígares y colaboradores (1997) dió además como resultado un incremento de valina, isoleucina, fenilalanina, alanina, hidroxiprolina, tirosina, ácidos aspártico, glutamina, glicina, ornitina, anserina y creatina, y un descenso de carnitina. La adición de metionina resultó en un incremento de leucina, isoleucina, metionina, hidroxiprolina, tirosina, cistina, glutamina y una disminución de histidina, glicina, treonina, glutamato y carnitina. En nuestro caso el perfil de aminoácidos libres en músculo dio resultados similares a los observados en plasma con concentraciones elevadas respecto al grupo de referencia para metionina, taurina y treonina y disminuidas para tirosina en los grupos alimentados con proteína sérica intacta o hidrolizada, especialmente de treonina en el caso del hidrolizado. El grupo que recibió proteína sérica intacta mostró valores superiores de citrulina, hidroxiprolina y glutámico + glutamina con respecto al de la dieta de referencia. Como en hígado, el hidrolizado de proteína sérica produjo una concentración de serina libre

inferior a la producida por la proteína sérica intacta. Una diferencia entre ambos tipos de fuentes proteicas observada en músculo fue una menor concentración de carnosina y 1-metilhistidina+anserina (estos últimos indistinguibles cromatográficamente en nuestros análisis) en aquellos grupos alimentados con proteína sérica intacta o hidrolizada, respecto a los que recibieron caseína, lo que quizás podría indicar una tasa menor de catabolismo proteico. La 1-metilhistidina como la 3-metilhistidina son aminoácidos característicos de las proteínas miofibrilares, y una vez degradada la proteína son excretados. En cualquier caso, además de las limitaciones cromatográficas encontradas, hay que considerar que realmente el indicador aceptado para el metabolismo proteico en músculo es la concentración de 3-metilhistidina medida en orina y corregida por creatinina, por lo que sería conveniente en futuros estudios cuantificar correctamente este parámetro y comprobar si el metabolismo proteico muscular difiere con la utilización de distintas fuentes de proteína.

Las relaciones observadas entre grupos de aminoácidos reflejan una clara diferencia entre la proteína sérica intacta o hidrolizada y la caseína, efecto agudizado en aquellos índices en que interviene la concentración de treonina para el hidrolizado. Así, las relaciones entre aminoácidos no esenciales y esenciales, y alanina y treonina fueron inferiores para la proteína sérica, y la relación metionina/ cisteína superior a la de las caseínas.

El grupo alimentado con la dieta basada en proteína sérica intacta, que obtuvo además el mayor coeficiente de eficacia en crecimiento, obtuvo valores superiores para aquellos índices que consideran la suma de los aminoácidos ramificados.

En resumen, de las diferencias de aminoácidos en plasma, hígado y músculo observadas entre grupos la más importante es muy elevada concentración de treonina en el grupo que recibió el hidrolizado de proteína sérica como fuente proteica, situación ampliamente descrita en la bibliografía, y que pudo ser la causante de una menor ingesta y menor coeficiente de eficacia en crecimiento en dicho grupo respecto al que recibió la misma fuente proteica intacta.

3.-Evaluación *in vitro* de la antigenicidad de los hidrolizados de proteínas lácteas.

Cordle, en 1994, en una evaluación comparativa de distintos métodos existentes para asegurar la calidad de productos alimentarios hipoalergénicos destacó la utilidad del uso del ELISA de inhibición para cuantificar la antigenicidad residual en hidrolizados proteicos. El ELISA de inhibición descrito para cuantificar caseína inmunológicamente activa tenía un coeficiente de regresión mayor de 0.999, una exactitud, medida mediante adiciones, del 107%, una precisión de $\pm 7\%$, con un límite de cuantificación de aproximadamente 10 ng/ml. Sawatzki y colaboradores en el mismo año recomiendan el uso del ELISA para la evaluación de antigenicidad residual en hidrolizados, previamente a cualquier estudio *in vivo*. Este tipo de métodos continúan desarrollándose para la evaluación de nuevos hidrolizados. Así, Cave y Guilford (2004) desarrollaron un ELISA de inhibición para evaluar la alergenicidad residual de un hidrolizado de proteínas de pollo para su posible inclusión en dietas de uso veterinario.

En el método desarrollado por nosotros para la cuantificación de proteína sérica inmunológicamente activa en un hidrolizado de proteína sérica, la evaluación de la exactitud se realizó analizando soluciones de proteína sérica en tampón UAB a concentraciones definidas y comparando los resultados obtenidos con el valor teórico. El método mostró una recuperación media del valor teórico dentro del rango establecido como válido, para este parámetro, en el estudio de prevalidación (90-120 %). Así la exactitud mostrada por el ensayo se consideró aceptable para la aplicación en la determinación de proteína sérica inmunológicamente activa en hidrolizados proteicos destinados a alimentación infantil.

El estudio de la variabilidad asociada al método se llevó a cabo siguiendo un diseño experimental que consistió en el análisis repetitivo de muestras de proteína sérica intacta (control positivo) e hidrolizados de proteína sérica. Los resultados obtenidos para cada muestra no superaron el de coeficiente de variación predeterminado como límite, por lo que el método resultó suficientemente preciso para cuantificar IAW en hidrolizados de proteína sérica.

Según Cordle (1994) en el ELISA de inhibición se requiere un anticuerpo específico, potente y altamente reactivo frente a la proteína estándar, así como una proteína estándar estable y bien caracterizada. El suero utilizado en la validación del método fue generado frente al mismo lote de proteína sérica usado como patrón. La especificidad por la misma fue puesta de manifiesto mediante inmunoblot por parte del proveedor del hidrolizado de proteína sérica (Arla Foods, datos no mostrados) y considerada aceptable para asegurar la calidad de nuestro método. Tradicionalmente se utilizaban anticuerpos frente a β -lactoglobulina, pero puesto que dentro de lo que hemos denominado proteína sérica no es la única proteína que contribuye a la antigenicidad, la utilización de un suero que detecta el conjunto de proteínas o péptidos inmunológicamente activos resulta una ventaja.

Al establecer la curva patrón (30-3000 ng /ml) quedaron determinados los límites de detección, de cuantificación y el rango. En el método, la densidad óptica aumenta conforme la concentración de IAW disminuye en las muestras. La señal comprendida entre el patrón de más baja concentración y la absorbancia máxima, así como aquella que supere la del estándar superior, no serán cuantificables con exactitud. En los análisis realizados a lo largo de todo el estudio, incluida la prevalidación, la concentración de las muestras de hidrolizados estuvo comprendida en la zona central de la curva patrón; así pues los límites de detección, cuantificación y el rango, fueron válidos para la aplicación que se pretende dar al método.

El nivel de sensibilidad mostrado por el ensayo, superó el mínimo establecido en la validación prospectiva y así se consideró aceptable para asegurar la calidad buscada.

El coeficiente r^2 de la curva, generada por el logaritmo de las concentraciones de los estándares y el logaritmo del porcentaje de inhibición de los mismos, cumplió con el requerimiento de superar el valor de 0.985. Como promedio, la linealidad mostrada resultó admisible para validar el método.

La valoración de la robustez del método, es decir, su capacidad para obviar la introducción de pequeñas variaciones en el desarrollo del mismo, se efectuó teniendo en cuenta los datos obtenidos en el estudio de precisión. Estos datos fueron generados a partir de reconstituciones individuales, hechas a diario por dos analistas distintos, durante tres días.

El coeficiente de variación de los resultados así generados, para el control positivo y para el hidrolizado control, fueron claramente inferiores al valor preestablecido como límite de aceptación, considerando que la robustez mostrada por el ensayo es aceptable para la utilización que se pretende dar al método.

En resumen, el método de ELISA competitivo desarrollado resultó válido para el uso que se pretendía darle, esto es, asegurar *in vitro* el carácter hipoantigénico de hidrolizados de proteína sérica, ingredientes potenciales en fórmulas infantiles hipoalérgicas, aunque como hemos mencionado en el apartado de antecedentes bibliográficos la prueba definitiva es la realización de un estudio clínico. El método desarrollado constituye, por lo tanto, una herramienta útil para el control de calidad de productos con estas características, que permitiría garantizar la seguridad alimentaria en términos de alergenidad, siempre teniendo en cuenta que es imprescindible un diagnóstico previo de los potenciales consumidores.

El hidrolizado de proteína sérica utilizado para desarrollar el método, como se ha mencionado anteriormente, tiene un grado de hidrólisis intermedio entre el de los hidrolizados de proteínas lácteas extensivos y los parciales, unas características organolépticas mejoradas, con respecto a los hidrolizados extensivos, y un comportamiento, en lo que a antigenicidad medida mediante ELISA de inhibición se refiere, más cercano a este tipo de hidrolizados que a los parciales.

4.-Evaluación *in vivo* de la alergenicidad de la fórmula hipoalergénica experimental.

La alergenicidad de nuevas fuentes proteicas a incluir en alimentos potencialmente hipoalergénicos y de las propias fórmulas se ha evaluado frecuentemente en cobayas permitiendo comparar la capacidad sensibilizante de diferentes proteínas o hidrolizados proteicos. La evaluación con este modelo de una fórmula basada en hidrolizado de proteína sérica, un hidrolizado de proteína sérica bovina y un hidrolizado de arroz, respectivamente, frente a una fórmula láctea convencional, detectó una menor capacidad sensibilizante de los hidrolizados (Boner *et al.*, 1992; Piacentini *et al.*, 1994; Piacentini *et al.*, 2003). Cordle en 1994 clasificó la obtención de resultados positivos en la sensibilización oral de cobayas como excelente método para predecir la actividad alérgica en alimentos, si bien considera que los resultados negativos solo sugieren hipoalergenicidad debido a una falta de sensibilidad del método. Fritsche en 2003 en una comparación entre distintos modelos *in vivo* destacó la ventaja de que la sensibilización sea por vía oral sin ayuda de adyuvantes, y la desventaja de que la respuesta esté mediada por IgG1a. Boza y colaboradores en 1995 evaluaron la capacidad inmunizadora vía oral de un hidrolizado de proteína sérica frente a proteína sérica intacta en un modelo de anafilaxia sistémica en cobayas, observando que el hidrolizado no inducía sensibilización mientras que la proteína intacta lo hacía en un 100% de los animales.

En nuestro ensayo la fórmula hipoalergénica experimental produjo resultados

indistinguibles en la evaluación de anafilaxia sistémica de una fórmula hipoalergénica comercial y del control negativo (agua), mientras que los grupos que recibieron leche de vaca y fórmula láctea convencional respondieron positivamente, como se describe en los estudios mencionados. En nuestro caso observamos además una menor capacidad sensibilizante de la fórmula láctea frente a la leche, derivada seguramente del tratamiento térmico a que ésta es sometida durante su fabricación. Puesto que la evaluación de la anafilaxia sistémica está basada en la observación, estos estudios se complementan con medidas de anticuerpos mediante ELISA, como en los estudios de Piacentini previamente mencionados, o pruebas de anafilaxia pasiva cutánea (Heyman et al., 1990; Kawabata et al., 1995). El sistema Ussing Chambers ha sido empleado para medir anafilaxia intestinal; Kitagawa y colaboradores (1995) evaluaron la alergenicidad relativa de una fórmula infantil basada en leche de vaca frente a leche de vaca observando una reducción de la capacidad sensibilizante en la fórmula. Este resultado se corresponde con los obtenidos por nosotros.

En nuestra evaluación de la anafilaxia intestinal usando un sistema Ussing Chambers encontramos, a diferencia de lo descrito en la bibliografía, una elevada variabilidad que impidió realizar un tratamiento estadístico de los datos. Lo que sí pudimos observar fue un comportamiento totalmente opuesto de los valores de I_{sc} al añadir al tejido β -lactoglobulina cuando este procedía de un animal sensibilizado (con respuesta positiva en el test de anafilaxia sistémica) que cuando el animal había recibido una de las fórmulas hipoalergénicas o agua (respuesta negativa en el test de anafilaxia sistémica). Otra limitación del sistema es que la estimulación tuvo que llevarse a cabo únicamente con β -lactoglobulina, ya que durante la realización de pruebas previas con una solución de proteína sérica o con una mezcla de ésta con caseína en proporciones 70:30 detectamos problemas de matriz, como la generación de espuma en las cámaras, que impedían obtener un valor estable de I_{sc} .

En resumen, nuestro producto hipoalergénico experimental se comporta igual en

cuanto a alergenidad que el producto hipoalergénico comercial con el que ha sido comparado. La utilización del sistema Ussing Chambers puede resultar útil para objetivar los resultados, si bien nuestro sistema ha mostrado serios problemas de repetibilidad y sería necesario optimizar el sistema para mejorar este aspecto.

Conclusiones

- 1.-La mezcla en proporción 70:30 de dos hidrolizados de proteína sérica y caseína tiene un perfil de aminoácidos cercano al de la leche materna y responde a los criterios de la OMS para satisfacer los requerimientos nitrogenados de los lactantes.
- 2.-La hidrólisis enzimática y el proceso tecnológico asociado afectan a la calidad nutricional de las proteínas lácteas, aunque el coeficiente de eficacia en crecimiento no difiere del de la proteína de referencia, caseína ANRC.
- 3.- Las diferencias observadas en perfil de aminoácidos en plasma, hígado y músculo de ratas alimentadas con las proteínas lácteas intactas o hidrolizadas indican una utilización metabólica diferente para ambas fuentes, aspecto más acentuado en el caso de la proteína sérica.
- 4.-Se ha desarrollado y validado un método ELISA competitivo que constituye una herramienta útil para el control de calidad de productos basados en hidrolizados de proteína sérica.
- 5.- El hidrolizado de proteína sérica evaluado en el presente estudio tiene una antigenicidad, medida mediante un ensayo de ELISA competitivo, del orden de 10^4 veces menor que la proteína de partida, lo que lo hace candidato ideal para la fabricación de productos dirigidos a niños alérgicos o intolerantes a las proteínas de la leche de vaca.
- 6.-La evaluación *in vivo* de la reactividad inmunológica en cobayas mediante la inducción de anafilaxia sistémica del producto hipoalergénico experimental, constituido por una mezcla de hidrolizados de proteína sérica y caseína en proporciones 70:30, ha mostrado ausencia de alergenicidad, confirmándose así los resultados de baja antigenicidad obtenidos en el ensayo *in vitro*.

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA:

Adamik B, Wlaszyk A. Lactoferrin- its role in defense against infection and immunotropic properties. *Postepy Hig Med Dosw*, 1996; 50: 33-41.

Aggett P, Leach JL, Rueda R, McLean WC Jr. Innovation in infant formula development: reassessment of ribonucleotides in 2002. *Nutrition*, 2003; 19: 375-384.

American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition. Soy protein-based formulas: recommendations for use in infant feeding. *Pediatrics*, 1998; 101: 148-153.

American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition. Hypoallergenic infant formulas. *Pediatrics*, 2000; 106: 346-349.

AOAC. Protein Efficiency Ratio. Rat Bioassay. Method 960.48. En: (dr. William Horwitz, editor) Gaithersburg, Maryland, USA. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 17th Edition, 2000; 45 : 62-63.

AOAC. Protein in milk. Kjeldahl method. Method 991.20. En: (dr. William Horwitz, editor) Gaithersburg, Maryland, USA. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 17th Edition, 2000; 33: 10-11.

Baró L, Guadix EM, Martínez-Augustín O, Boza JJ, Gil A. Serum amino acid concentrations in growing rats fed intact protein versus enzymatic protein hydrolysate-based diets. *Biol Neonate*. 1995; 68: 55-61

Bieber T, Kraft S, Jugend M, Strobel I, Haberstock J, Tomov H. New insights in the structure and biology of the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI) on human epidermal Langerhans cells. *J Dermatol Sci*, 1996, 13: 71-75.

Bock SA, Muñoz-Furlong A, Sampson HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol*, 2001; 107: 191-193.

Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics*, 1987; 79: 683-688.

Boehm G, Cervantes H, Georgi G, Jelinek J, Sawatzki G, Wermuth B, Colombo JP. Effect of increasing dietary threonine intakes on amino acid metabolism of the central nervous system and peripheral tissues in growing rats. *Pediatr Res*. 1998; 44:900-906.

Boner AL, Benedetti M, Spezia E, Piacentini GL, Bellanti JA. Evaluation of the allergenicity of infant formulas in a guinea pig model. *Ann Allergy*. 1992; 68:404-406.

Mitchell HH. A method determining the biological value of protein. *J Biol Chem*. 1923; 58: 873-903.

Boza JJ, Jiménez J, Martínez O, Suárez MD, Gil A. Nutritional value and antigenicity of two milk protein hydrolysates in rats and guinea pigs. *J Nutr*, 1994; 124 :1978-1986.

Boza JJ, Martinez-Augustin O, Baró L, Suarez MD, Gil A. Protein v.enzymic protein hydrolysates. Nitrogen utilization in starved rats. *Br J Nutr*. 1995; 73: 65-71.

Boza J, Martinez O, Baro L, Suarez MD, Gil A. Influence of casein and casein hydrolysate diets on nutritional recovery of starved rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1995; 19:216-221.

Boza J, Jimenez J, Baro L, Martinez O, Suarez MD, Gil A. Effects of native and hydrolyzed whey protein on intestinal repair of severely starved rats at weaning. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1996; 22:186-193.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.

Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: phenotypic characterstic, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol rev*, 2005; 206: 32-63.

Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2000; 106:27-36.

Bruno G, Giampietro PG, Del Guercio MJ. Soy allergy is not common in atopic children: a multicenter study. *Pediatr Allergy Immunol*, 1997; 8: 190-193.

Bruno G, Milita O, Ferrara M, Nisini R, Cantani A, Businco L. Prevention of atopic diseases in high risk babies (long-term follow-up. *Allergy Proc*, 1993; 14: 181-187.

Brunser O, Espinoza J, Araya M, Cruchet S, Gil A. Effect of dietary nucleotide supplementation on diarrhoeal disease in infants. *Acta Paediatr*, 1994; 83: 188-191.

Buck RH, Thomas DL, Winship TR, Cordle CT, Kuchan MJ, Baggs GE, Schaller JP, Wheeler JG. Effect of dietary ribonucleotides on infant immune status. Part 2: Immune cell development. *Pediatr Res*, 2004 ; 56: 891-900.

Buescher ES & Malinowska I. Soluble receptors and cytokine antagonists in human milk. *Pediatric Res*, 1996; 40: 839-844.

Burks AW, James JM, Hiegel A. Atopic dermatitis and food hypersensitivity reactions. *J Pediatr*, 1998; 132: 132-136.

Businco L, Bellanti J., Catassi C., Cavagni G., Corrias A., Fiocchi A., Giovannini M., Hamburger R., Marcucci F., Molkhou P., Secretin M. C., Zannino L. Food allergy in childhood. Hypersensitivity to cows' milk allergens. *Clin Exp Allergy*, 1993; 23: 481-483.

Businco L, Cantani A, Longhi MA, Giampietro PG. Anaphylactic reactions to a cow's milk whey protein hydrolysate (Alfaré, Nestlé) in infants with cow's milk allergy. *Ann Allergy*, 1989; 62: 333-335.

Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. *Adv Enzyme Regul*, 1997; 37:197-237.

Call RS, Smith TF, Morris E, Chapman MD, Platts-Mills TA. Risk factors for asthma in inner city children. *J Pediatr*, 1992; 121: 862-866.

Campbell DA, Lorber MI, Sweeten JC, Turcoite JC, Niederhuber J, Beer AE. Breast-feeding and maternal-donor renal allografts. *Transplantation*, 1984; 37: 340-344.

Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am J Clin Nutr*, 2004; 80: 1717S-1720S.

Carver JD, Pimentel B, Cox WI, Barness LA. Dietary nucleotide effects upon immune function in infants. *Pediatrics*, 1991; 88: 359-363.

Cave NJ, Guilford WG. A method for in vitro evaluation of protein hydrolysates for potential inclusion in veterinary diets. *Res Vet Sci*. 2004; 77: 231-238.

Celedon JC, Litonjua AA, Ryan L, Platts-Mills TAE, Weiss ST, Gold DR. Exposure to cat allergen, maternal history of asthma, and wheezing in first 5 years of life. *Lancet*, 2002; 360: 781-782.

Cervantes LE, Newburg DS, Ruiz-Palacios GM. a-1-2 Fucosylated chains (H-2 and Lewis^b) are the human milk receptor analogs for *Campylobacter*. *Pediatric Res*, 1995; 37: 171A.

Chandra R.K. Five-year follow up of high-risk infants with family history of allergy exclusively breast-fed or fed partial whey hydrolysate, soy and conventional cow's milk formulas. *Nutr Res*, 1998; 18: 8: 1395-1411.

Chandra RK, Shakuntla P, Hamed A. Influence of maternal diet during lactation and use of formula feeds on development of atopic eczema in high risk infants. *Br Med J*, 1989; 299: 228-230.

Chandra RK, Singh G, Shridhara B. Effect of feeding whey hydrolysate, soy, and conventional cow's milk formulas on incidence of atopic disease in risk infants. *Ann Allergy*, 1989; 63: 102-106.

Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Vila L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergy patients. *Clin Exp Allergy*, 2001; 31: 1256-1262.

CODEX STANDARD FOR INFANT FORMULA. (CODEX STAN 72, 1981).

Cookson WOCM, Faux J, Sharp PA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet*, 1989; 1: 1292-1294.

Coop RL, Holmes PH. Nutrition and parasite infection. *Int J Parasitol*, 1996; 26: 951-962.

Cordle C.T. Control of food allergies using protein hydrolysates. *Food Tech*, 1994: 72-76.

Cordle C.T., Duska-McEwen G., Janas L.M., Malone W.T., Hirsch M.A. Evaluation of the immunogenicity of protein hydrolysate formulas using laboratory animal hyperimmunization. *Pediatr Allergy Immunol*, 1994; 5: 14-19.

Cordle CT, Winship TR, Schaller JP, Thomas DJ, Buck RH, Ostrom KM, Jacobs JR, Blatter MM, Cho S, Gooch WM 3rd, Pickering LK. Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: part 2: immune cell populations. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002; 34: 145-153.

Crim MC, Munro HN. Proteins and Amino Acids. En: (Shils, Olson, Shike). *Modern Nutrition in Health and Disease*, 8th Edition, 1994; 1: 3-35.

Cripps AW, Gleeson M. Ontogeny of mucosal immunity and aging. En: (PL Ogra, J Mestecky, ME Lamm, W Strober, J Bienenstock, JR McGhee, editors). San Diego, CA: Academic Press. *Mucosal Immunology*, 2nd ed. 1999: 253- 266.

Cosgrove M, Davies DP, Jenkins HR. Nucleotide supplementation and the growth of term small for gestational age infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 1996; 74: F122-F125.

Czarnecki GL, Baker DJ. Urea cycle function in the dog with emphasis on the role of arginine. *J Nutr*, 1984; 114: 581-590.

Das U. Essential fatty acids as possible enhancers of the beneficial actions of probiotics. *Nutrition*, 2002; 18: 786-789.

Davis TA, Burrin DG, Fiorotto ML, Reeds PJ, Jahoor F. Roles of insulin and amino acids in the regulation of protein synthesis in the neonate. *J Nutr*, 1998; 128 : 347S-350S.

de Regil LM, de la Barca AM. Nutritional and technological evaluation of an enzymatically methionine-enriched soy protein for infant enteral formulas . *Int J Food Sci Nutr*, 2004; 55: 91-99.

Debbabi H, Dubarry M, Rautureau M, Tome D. Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice. *J Dairy Res*, 1998; 65: 283-293.

Decsi T, Veitl V, Szasz M, Pinter Z, Mehes K. Plasma amino acids in healthy, full-term infants fed hydrolysate infant formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1996; 22: 62- 67.

Dosch HM, Martin JM, Bobinson BH, Akerblom HK, Karjalainen J. An immune basis for disproportionate diabetes risks in children with atype I diabetic mother or father. *Diabetes Care*, 1993; 16: 949-951.

Duffy DL. Applying statistical approaches in the dissection of genes versus enviroment for asthma and allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2001; 1: 431-434.

Ebel F, Schmitt E, Peter-Katalinic J, Kniep B, Mühlradt PF. Gangliosides: Differentiation Markers for Murine T Helper Lymphocyte Subpopulations TH1 and TH2. *Biochemistry*, 1992; 31:12190-12197.

Edmonds MS, Baker DH. Failure of excess dietary lysine to antagonize arginine in young pigs. *J Nutr* 1987; 117:1396-1401

Elitsur Y, Neace C, Liu X, Dosesco J, Moshier JA. Vitamin A and retinoic acids immunomodulation on human gut lymphocytes. *Immunopharmacology*, 1997; 35: 247-253.

ESPGAN Committee on Nutrition. Guidelines on infant nutrition. I. Recommendations for the composition of an adapted formula. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1977;(262):1-20

ESPGAN committee on nutrition: Aggett P.J., Haschke F., Heine W., et al. Comment on antigen-reduced infant formulae. *Acta Paediatr*, 1993; 82: 314-319.

Evoy D, Lieberman MD, Fahey TJ III, Daly JM. Immunonutrition: role of arginine. *Nutrition*, 1998, 14: 611-617.

Exl BM. A review of recent developments in the use of moderately hydrolyzed whey formulae in infant nutrition. *Nutr Res*, 2001; 21: 355-379.

Exl, BM, Deland U, Wall M, Preysch U, Secretin MC, Shmerling DH, Zug-Frauenfeld nutritional survey ("Zuff study"): allergen-reduced nutrition in a normal infant population and its health-related effects: results at the age of six months. *Nutr Res*, 1998; 18: 8: 1443-1462.

Exl BM, Fritsche R. Cow's milk protein allergy and possible means for its prevention. *Nutrition*, 2001; 17: 642-651.

FAO-WHO. Protein report, 2005. (en prensa; cedido por A.Gil)

Fergusson DM, Horwood LJ, Shannon FT. Asthma and infant diet. *Arch Dis Child*, 1983; 58: 48-51.

Fernández-Figares I, Prieto C, Nieto R, Aguilera JF. Free amino acid concentrations in plasma, muscle and liver as indirect measures of protein adequacy in growing chickens. *Animal Science*. 1997; 64: 529-539

Field CJ, Clandinin MT, Van Aerde JE. Polyunsaturated fatty acids and T-cell function: implications for the neonate. *Lipids*, 2001; 36: 1025-1032.

Frank L, Marian A, Visser M, Weinberg E, Potter PC. Exposure to peanuts in utero and in infancy and the development of sensitization to peanut allergens in young children. *Pediatr Allergy Immunol*, 1999; 10: 27-32.

Friedman SJ, Cheng S, Skehan P. The occurrence of polysialogangliosides in a human trophoblast cell line. *FEBS Lett*, 1983; 152: 175-179.

Fritsche R. Animal models in food allergy: assessment of allergenicity and preventive activity of infant formulas. *Toxicol Lett*, 2003; 140-141: 303-309.

Garcia-Ara MC, Boyano-Martinez MT, Diaz-Pena JM, Martin-Munoz MF, Martin-Esteban M. Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants. *Clin Exp Allergy*, 2004; 34: 866-870.

Garside P, Millington O, Smith KM. The anatomy of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1029: 9-15.

Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD, et al. Relation between house-dust endotoxin exposure, type T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet*, 2000; 355: 1680-1683.

Gibson GR, Robertfroid MB. Dietary modulation of human colonic microbiota, introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 1994; 125: 1401-1412.

Gil A, Corral E, Martínez A, Molina JA. Effects of the addition of nucleotides to an adapted milk formula on the microbial patterns of faeces in at term newborn infants. *J Clin Nutr Gastroenterol*, 1986, 1: 127-132.

Gil A. New additions to infant formulas. En: (CH Lifschitz, editor). New York: Marcel Dekker. *Pediatric Gastroenterology and Nutrition in Clinical Practice*, 2002; 113-135.

Gil A, Rueda R. Interaction of early diet and the development of the immune system. *Nutr Res Rev*, 2002, 15: 263-292.

Gil A, Sanchez de Medina F. Aminoácidos semiesenciales y derivados de aminoácidos de interés nutricional. En: (Gil, A, editor) Editorial Grupo Acción Médica. *Tratado de nutrición*. 2005, 1; 15: 489-521.

- Giovannini M., Agostini C., Fiocchi A., Bellú R., Trojan S., Riva E. Antigen-reduced infant formulas versus human milk: growth and metabolic parameters in the first 6 months of life. *J Am Coll Nutr*, 1994; 13; 4: 357-363.
- Goldman AS, Garza C, Johnson CA, Nichols BL, Goldblum RM. Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. *J Pediatr*, 1982; 100: 563-567.
- Goldman AS. The immune system of human milk: antimicrobial, anti-inflammatory, and immunomodulating properties. *Pediatr Infect Dis J*, 1993; 12: 664-672.
- Hahn-Zoric M, Fulconis F, Minoli I, Moro C, Carlsson B, Böttigen M, Rähä N, Hanson LA. Antibody responses to parenteral and oral vaccines are impaired by conventional and low protein formulas as compared to breast-feeding. *Acta Paediatr Scand*, 1990; 79: 1137-1142.
- Halken S, Hansen KS, Jacobsen HP. Comparison of a partially hydrolyzed formulas for allergy prevention: a prospective, randomized study. *Pediatr Allergy Immunol*, 2000; 11: 149-161.
- Hanson LA, Korotkova M, Telemo E. Breast-feeding, infant formulas, and the immune system. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2003; 90: 59-63.
- Hanson LA, Telemo E, Wiedermann U, Dahlman-Höglund A, Lundin S, Friman V, Dahlgren U. Immunological mechanisms of the gut. *Pediatr Allergy Immunol*, 1995; 6: 7-12.
- Harris DA, Burns RA, Ali R. Evaluation of infant formula protein quality: a comparison of *in vitro* with *in vivo* methods. *J Assoc Off Anal Chem*, 1988; 71: 353-357.
- Hattevig G, Kjellman B, Sigurs N, Bjorksten B, Kjellman NIM. Effect of maternal avoidance of eggs, cow's milk and fish during lactation upon allergic manifestations in infants. *Clin Exp Allergy*, 1989; 19: 27-32.
- Hattevig G, Sigurs N, Kjellman B. Effects of maternal dietary avoidance during lactation on allergy in children at 10 years of age. *Acta Paediatr*. 1999 Jan;88(1):7-12.
- Hauser B, Blecker U, Keymolen K, Suys B, Gerlo E, Vandenplas Y. Plasma amino acid concentrations in term-born infants fed a whey predominant or a whey hydrolysate formula. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1997; 21: 27-30.
- Hawkes JS, Gibson RA, Robertson D, Makrides M. Effect of dietary nucleotide supplementation on growth and immune function in term infants: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*. 2006 Feb; 60: 254-264.

Hernell O, Lonnerdal B. Nutritional evaluation of protein hydrolysate formulas in healthy term infants: plasma amino acids, hematology, and trace elements. *Am J Clin Nutr*, 2003; 78: 296-301.

Heyman M, Andriantsoa M, Crain-Denoyelle AM, Desjeux JF. Effect of oral or parenteral sensitization to cow's milk on mucosal permeability in guinea pigs. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1990;92:242-246.

Hill DJ, Hosking CS, Zhi CY, Leung R, Baratwidjaja K, Iikura Y, Iyngkaran N, Gonzalez-Andaya A, Wah LB, Hsieh KH. The frequency of food allergy in Australia and Asia. *Environ Toxicol Pharmacol*, 1997; 4: 101-110.

Host A, Halken S, Jacobsen HP, Eastmann A, Mortensen S, Mygil S. The natural course of cow's milk protein allergy/intolerance. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 99: S490.

Host A, Halken S. Hypoallergenic formulas- when, to whom and how long: after more than 15 years we know the right indication!. *Allergy*, 2004; 59 (Suppl. 78): 45-52.

Host A., Koletzko B., Dreborg S., Muraro A., Wahn U, Aggett P.J., Bresson J.L., Hernell O., Lafeber H., Michaelsen K.F., Micheli J.L., Rigo J., Weaver L., Heymans H., Strobel S., Vandenplas Y. Joint statement of ESPACI and ESPGHAN. Dietary products used in infants for treatment and prevention food allergy. *Arch Dis Child*, 1999; 81: 80-84.

Hugh A, Sampson MD. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113: 805-819.

Hughes DA, Pinder AC. N-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes. *Am J Clin Nutr*, 2000; 71: 357S-360S.

Hughes DA, Pinder AC. N-3 polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes and inhibit antigen-presentation in vitro. *Clin Exp Immunol*, 1997; 110: 516-523.

Hurt HD, Forsythe RH, Krieger CH. Factors which influence the biological evaluation of protein quality by the protein efficiency ratio method. En: [Mendel Friedman, editor] *Marcel Dekker, Inc. New York. Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds*. 1975, 1, 8: 87-112.

Husby S, Foged N, Host A, Svehag SE. Passage of dietary antigens into the blood of children with coeliac disease. Quantification and size distribution of absorbed antigens. *Gut*, 1987; 28: 1062-1072.

Isolauri E, Sutas Y, Makinen-Kiljunen S, Oja SS, Isosomppi R, Turjanmaa K. Efficacy and safety of hydrolyzed cow milk and amino acid-derived formulas in infants with cow milk allergy. *J Pediatr*. 1995;127: 550-557.

- Jacobs FA, Crandall JC. Response of tissue amino acids of the rat to casein and wheat protein diets. *Nutr Rep Intern*. 1972; 5: 27-36
- James JM, Bernhisel-Broadbent J, Sampson HA. Respiratory reactions provoked by double-blind food challenges in children. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994; 149: 59-64.
- James JM, Eigenmann PA, Eggleston PA, Sampson HA. Airway reactivity changes in food-allergic, asthmatic children undergoing double-blind placebo-controlled food challenges. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996; 153: 597-603.
- Janas LM, Picciano MF, Hatch TF. Indices of protein metabolism in term infants fed either human milk or formulas with reduced protein concentrations and various whey/casein ratios. *J Pediatr*, 1987; 110: 838-848.
- Jarvenpaa AL, Raiha NCR, Rassin DK, Gaull GE. Milk protein quantity and quality in the term infant. I. Metabolic responses and effects on growth. *Pediatrics*, 1982; 70: 214-220.
- Jarvenpaa AL, Rassin DK, Raiha NCR, Gaull GE. Milk protein quantity and quality in the term infant.II. Effects on acidic and neutral amino acids. *Pediatrics*, 1982; 70: 221.
- Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy . *Int Arch Allergy Immunol*, 2001 Oct; 126: 111-118.
- Johansson SGO, Hourihane JO'B, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M, Wüthrich B. A revised nomenclature for allergy. *Allergy*, 2001; 56: 813-824.
- Judd L. A descriptive study of occupational skin disease. *N Z Med J*, 1994; 107:147-149.
- Kajosaari M. Atopy prophylaxis in high-risk infants: prospective 5-year follow-up study of children with six months exclusive breast-feeding and solid food elimination. *Adv Exp Med Biol*, 1991; 310: 453-458.
- Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvillommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2003; 361: 1869-1871.
- Kawabata TT, Babcock LS, Gauggel DL, Asquith TN, Fletcher ER, Horn PA, Ratajzak HV, Graciano FM. Optimization and validation of an ELISA to measure specific guinea pig IgG1 antibody as an alternative to the *in vivo* passive cutaneous anaphylaxis assay. *Fundam Appl Toxicol*. 1995; 24: 238-246
- Keeney SE, Schmalstieg FC, Palkowetz KH, Rudloff HE, Le BM, Goldman AS. Activated neutrophils and neutrophil activators in human milk. Increased expression of CD11b and decreased expression of L-selectin. *J Leukoc Biol*, 1993; 54: 97-104.

Kelly KJ. Eosinophilic gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000; 30(suppl): S28-S35.

Kemeny DM. The effects of pollutants on the allergic immune response. *Toxicology*, 2000; 152: 3-12.

Keusch GT. Immunity- role of iron and zinc. En: (MJ Sadler, JJ Strain, B Caballero, editors). London: Academic Press. *Encyclopedia of Human Nutrition*. 1999, 1081-1085.

Kitagawa S, Zhang S, Harari Y, Castro GA. Relative allergenicity of cow's milk-based formulas in an animal model. *Am J Med Sci*, 1995; 310: 183-187.

Klein N, Schwertmann A, Peters M, Kunz C, Strobel S. Immunomodulatory effects of breast milk oligosaccharides. *Adv Exp Med Biol*, 2000; 478: 251-259.

Knippels MJL, van Wijk F, Penninks AH. Food allergy: what do we learn from animal models?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2004; 4: 205-209.

Kolb H, Pozzilli P. Cow's milk and type I diabetes: the gut immune system deserves attention. *Immunol Today*, 1999; 20: 108-110.

Koletzko B, Baker S, Cleghorn G, Neto UF, Gopalan S, Hernell O, Hock QS, Jirapinyo P, Lonnerdal B, Pencharz P, Pzyrembel H, Ramirez-Mayans J, Shamir R, Turck D, Yamashiro Y, Zong-Yi D. Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;41:584-599.

Koletzko S, Sherman P, Corem M, Griffiths A, Smith C. Role of infant feeding practices in Crohn's disease in childhood. *Br Med J*, 1989; 298: 1617-1618.

Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH et al. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3: 454-462.

Kunz C, Rudolff S. Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr*, 1993; 82: 902-912.

Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: Structural, functional, and metabolic aspects. *Ann Rev Nutr*, 2000; 20: 699-722.

Kuvibidila S, Lolie Y, Ode D, Warriar RP. The immune response in protein-energy malnutrition and single nutrient deficiencies. En: (DM Klurfeld, editor). New York: Plenum . *Human Nutrition, a Comprehensive Treatise*, 1993; 121-155.

Lake AM. Food-induced eosinophilic proctocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000; 30: S58-S60.

Larbier M, Guillaume J. Effect of supplementing the ration with increasing amounts of DL-methionine on the free amino acid content of the egg yolk. *Annls Biol Anim Biochim Biophys*. 1972; 12: 647-659

Lee SK, Knifer WT, Cook CD, Heiner DC. Cow's milk-induced pulmonary disease in children. *Adv Pediatr*, 1978; 25: 39-57.

Li J, King BK, Janu PG, Renegar KB, Kudsk KA. Glycyl-L-glutamine enriched total parenteral nutrition maintains small intestine gut-associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1998; 22: 31-36.

Li XM, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GI, Sampson HA. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103: 206-214.

Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR. Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? *Am J Crit Care Med*, 1998; 158: 176-181.

Lonnerdal B, Chen CL. Effects of formula protein level and ratio on infant growth, plasma amino acids and serum trace elements. II. Follow-up formula. *Acta Paediatr Scand*, 1990; 79: 266-273.

Lonnerdal B. Immunological considerations of breast milk. En: (ME Gershwin, JB German, CL Keen, editors). Totowa, NJ: Humana Press. *Nutrition and Immunology*, 2000: 171-180.

Lonnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr*, 2003; 77: 1537S-1543S.

Makinen-Kiljunen S, Sorva R. Bovine beta-lactoglobulin levels in hydrolysed protein formulas for infant feeding. *Clin Exp Allergy*, 1993; 23: 287-291.

Maldonado-Lozano J, Gil-Campos M. Nutrición del lactante. En: (Gil, A, editor) Editorial Grupo Acción Médica. *Tratado de nutrición*. 2005, 3; 9: 277-298.

Manhart N, Roth E. Influence of fructo-oligo-saccharides on Peyer's patch lymphocytes in healthy and endotoxemic mice. *Clin Nutr*, 2001; 20: 3-14.

Manhart N, Vierlinger K, Spittler A, Bergmeister H, Roth E. Effects of orally administered glutamine on lymphocyte subpopulations in Peyer's patches in endotoxin boosted mice. *Immunol Lett*, 1999; 69: 25-33.

Mariotti F, Huneau JF, Mahe S, Tome D. Protein metabolism and the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2000; 3: 45-50.

- Marshall GD. Internal and external environmental influences in allergic diseases. *J Am Osteopath Assoc*, 2004; 104: S1-S6.
- Martin-Esteban M, Pascual CY. Food allergies in Spain: causal allergens and diagnostic strategies. *Pediatr Pulmonol Suppl*, 1999; 18: 154-156.
- Martinez-Augustin O, Puerta V, Suarez MD. Vitamina D. En: (Gil, A, editor)Editorial Grupo Acción Medica. *Tratado de nutrición*. 2005, 1; 24: 793-824.
- Martinez-Augustin O, Boza JJ, Del Pino JJ, Lucena J, Martinez-Valverde A, Gil A. Dietary nucleotides might influence the humoral immune response against cow's milk proteins in preterm neonates. *Biol Neonate*, 1997; 71: 215-223.
- May CD, Remigio L, Bock SA. Usefulness of measurements of antibodies in serum in diagnosis of sensitivity to cow's milk and soy proteins. *Allergy*, 1980; 35: 301-310.
- Mayer L. Mucosal immunity. *Pediatrics*, 2003; 111: 1595-1600.
- McClure SJ, McClure TJ, Emery DL. Effects of molybdenum intake on primary infection and subsequent challenge by the nematode *Trichostrongylus colubriformis* in weaned Merino lambs. *Res Vet Sci*, 1999; 67: 17-22.
- McLaughlan P, Anderson KJ, Coombs RRA. An oral screening procedure to determine the sensitizing capacity of infant feeding formulae. *Clin Allergy*, 1981; 11: 311-318.
- Michel FB, Bousquet J, Greillier P, Robinet-Levy M, Coulomb Y. Comparison of cord blood immunoglobulin E and maternal allergy for the prediction of atopic disease infancy. *J Allergy Clin Immunol*, 1980; 65: 422-430.
- Miller BD, Wood BL. Emotions and family factors in childhood asthma: psychobiologic mechanism and pathways of effect. *Adv Psychosom Med*, 2003; 24: 131-160.
- Millward DJ. Requirements and role in diet. En: (MJ Sadler, JJ Strain, B Caballero, editors). London: Academic Press. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 1999; 1661-1679.
- Mizunuma T, Kawamura S, Kishino V. Effects of ingesting excess arginine on rat pancreas. *J Nutr*, 1984; 114: 467-471.
- Modifi S. Nutritional management of pediatric food hypersensitivity. *Pediatrics* 2003; 111: 1645-1653
- Moran-Penco JM, Martinez-Tallo E, Agulla-Rodiño E. Nutrición parenteral total en pediatría. En: (Gil, A, editor)Editorial Grupo Acción Medica. *Tratado de nutrición*. 2005, 4; 10: 271-300.

Moreno-Villares JM, Pedron-Giner C. Nutrición enteral en el paciente pediátrico. En: (Gil, A, editor) Editorial Grupo Acción Médica. Tratado de nutrición. 2005, 4; 9: 239-265.

Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero L, Meinen-Derr JK, Farkas T, Chaturvedi P, Pickering LK, Newburg DS. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr*. 2004; 145: 297-303.

Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3: 331-341.

Munoz-Furlong A, Sampson HA, Sicherer SH. Prevalence of self-reported seafood allergy in the US. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113: S100.

Myrvik QN. Immunology and Nutrition. *Modern Nutrition in Health and Disease*. (ME Shills, JA Olson, M Shike, editors). Philadelphia: Lea & Febiger. 1994, 632-662.

Nakano T, Sugawara M, Kawakami H. Sialic acid in human milk: composition and functions. *Acta Paediatr Taiwan*, 2001; 42: 11-17.

Nashar TO, Webb HM, Eaglestone S, Williams NA, Hirst TR. Potent immunogenicity of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93: 226-230.

Navarro J, Ruiz-Bravo A, Jimenez-Valera M, Gil A. Modulation of antibody-forming cell and mitogen-driven lymphoproliferative responses by dietary nucleotides in mice. *Immunol Lett*, 1996; 53: 141-145.

Navarro J, Maldonado J, Narbona E, Ruiz-Bravo A, García Salmerón JL, Molina JA, Gil A. Influence of dietary nucleotides on plasma immunoglobulin levels and lymphocyte subsets of preterm infants. *BioFactors* 1999; 10: 67-76.

Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr*, 2005; 25: 37-58.

Newby FD, Price SR. Determinants of protein turnover in health and disease. *Miner Electrolyte Metab*, 1998; 24: 6-12.

Nguema GN, Grizard J, Alliot J. The reduction of protein intake observed in old rats depends on the type of protein. *Exp Gerontol*. 2004; 39:1491-1498.

Nicolas ME, Krause PK, Gibson LE, Murray JA. Dermatitis herpetiformis. *Int J Dermatol*, 2003; 42: 588-600.

Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. CX3CR1-Mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 2005; 307: 254-258.

Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA, Wood RA, Sicherer SH. Food protein-induced enterocolitis syndrome caused by solid food proteins. *Pediatrics*, 2003; 111: 829-835.

Oldaeus G, Anjou K, Bjorksten B, Moran RJ, Kjellman NIM. Extensively and partially hydrolysed infant formulae for allergy prophylaxis. *Arch Dis Child*, 1997; 77: 4-10.

Ostrom KM, Cordle CT, Schaller JP, Winship TR, Thomas DJ, Jacobs JR, Blatter MM, Cho S, Gooch WM 3rd, Granoff DM, Faden H, Pickering LK. Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: part 1: vaccine responses, and morbidity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002; 34: 137-144.

Otnaess ABK, Laegreid A, Ertresrag K. Inhibition of enterotoxin from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* by gangliosides from human milk. *Infect Immun*, 1983; 40: 563-569.

Pabsts H & Spady DW. Effect of breastfeeding on antibody response to conjugate vaccine. *Lancet*, 1990; 336: 269-270.

Pantako OT, Amiot J. The effects of alpha-lactalbumin and whey protein concentrate on alpha-amino acids, calcium and phosphorus levels in blood and gastrointestinal tract of rats. *Reprod Nutr Dev*. 2001; 41:227-238.

Petzke KJ, Schuppe S, Rohn S, Rawel HM, Kroll J. Chlorogenic acid moderately decreases the quality of whey proteins in rats. *J Agric Food Chem*. 2005; 53:3714-3720.

Piacentini GL, Bertolini A, Spezia E, Piscione T, Boner AL. Ability of a new infant formula prepared from partially hydrolyzed bovine whey to induce anaphylactic sensitization: evaluation in a guinea pig model. *Allergy*. 1994;49:361-364.

Piacentini GL, Vicentini L, Bodini A, Mazzi P, Peroni DG, Maffei C, Boner AL. Allergenicity of a hydrolyzed rice infant formula in a guinea pig model. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003; 91:61-64.

Pickering LK, Granoff DM, Erickson JR, Masor ML, Cordle CT, Schaller JP, Winship TR, Paule CL, Hilty MD. Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing nucleotides. *Pediatrics*, 1998; 101: 242-249.

Pion R. The relationship between the levels of free amino acids in blood and muscle and the nutritive value of proteins. In: *Proteins in human nutrition*. JWG Porter y BA Rolls (editors). Academic Press. 1973: 329-342

Polberger S, Raiha NC, Juvonen P, Moro GE, Minoli I, Warm A. Individualized protein fortification of human milk for preterm infants: comparison of ultrafiltrated human milk protein and a bovine whey fortifier. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999; 29:332-338

Prescott SL, Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and allergic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004; 7: 123-129.

Raiha NCR, Minoli I, Moro G, Bremer HJ. Milk protein intake in term infants. II. Effects on plasma amino acid concentrations. *Acta Paediatr Scand*, 1986; 75: 887-892.

Raiha NCR, Suihkonen J. Factors influencing the development of urea-synthesizing enzymes in rat liver. *Biochem J*, 1968; 107: 793.

Raqib R, Roy SK, Rahman MJ, Azim T, Ameer SS, Chisti J, Anders J. Effect of zinc supplementation on immune and inflammatory responses in paediatric patients with shigellosis. *Am J Clin Nutr*, 2004; 79: 444-450.

Rassin DK, Gaull GE, Raiha NCR, Heinonen K. Milk protein quantity and quality in low birth-weight infants. IV. Effects on tyrosine and phenylalanine in plasma and urine. *Pediatrics*, 1977; 90: 356-360.

Rassin DK. Neonatal requirements for amino acids. En: (Cynober LA, editor) *CRC Press. Metabolic and Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition*. 2nd Edition, 2003; 28: 471-482.

Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol*, 2002; 109: 119-121.

Redmon HP, Stapleton PP, Neary P, Bouchier-Hayes D. Immunonutrition: role of taurine. *Nutrition*, 1998; 14: 599-604.

Reeds PJ, Burrin DG, Davis TA, Fiorotto ML, Stoll B, van Goudover JB. Protein nutrition of the neonate. *Proc Nutr Soc*, 2000; 59: 87-97.

Reilly E. Selenium - Physiology, dietary sources and requirements. *Encyclopedia of Human Nutrition*. (MJ Sadler, JJ Strain, B Caballero, editors). London: Academic Press, 1999; 1752-1758.

Restani P, Velona T, Plebani A. Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting for residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. *Clin Exp Allergy*, 1995; 25:651-658.

Richardson LR, Cannon ML, Webb BD. Relation of dietary protein and lysine to free amino acids in chick tissues. *Poultry Sci.* 1965; 44: 248-257.

Rigo J, Salle BL, Putet G, Senterre J. Nutritional evaluation of various protein hydrolysate formulae in term infants during the first month of life. *Acta Paediatr*, 1994; 402 : 100-104.

Rigo J., Salle B.L., Cavero E., Richard P., Putet G., Senterre J. Plasma amino acid and protein concentrations in infants fed human milk or a whey protein hydrolysate formula during the first month of life. *Acta Paediatr*, 1994; 83: 127-131.

Rigo J, Boehm G, Georgi G, Jelinek J, Nyambugabo K, Sawatzki G, Studzinski F. An infant formula free of glycomacropeptide prevents hyperthreoninemia in formula-fed preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001; 32:127-30.

Roberts G, Golder N, Lack G. Bronchial challenges with aerosolized food in asthmatic, food-allergic children. *Allergy*, 2002; 57: 713-717.

Rognum TO, Thrane PS, Stolenberg L, Vege A, Brandtzaeg P. Development of intestinal mucosal immunity in fetal life and the first postnatal months. *Pediatr Res*, 1992; 32:145-149.

Rollwagen FM, Baqar S. Oral cytokine administration. *Immunol Today*, 1996; 17: 548-550.

Romagnani S. Regulation of Th2 development in allergy. *Curr Opin Immunol*, 1994; 6: 838-846.

Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduce immune suppression, or both?. *Immunology*, 2004; 112: 352-363.

Rosendal A, Barkholt V. Detection of potentially allergenic material in 12 hydrolyzed milk formulas. *J Dairy Sci*, 2000; 83: 2200-2210.

Rothenberg ME, Mishra A, Collins MH, Putnam PE. Pathogenesis and clinical features of eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2001; 108: 891-894.

Rothenberg ME. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113: 11-28.

Rueda R. Sistema inmunológico intestinal: nutrición e inmunidad. En: (Gil, A, editor) Editorial Grupo Acción Medica. Tratado de nutrición. 2005, 1; 36: 1233-1260.

Rueda R, Gil A. Influence of dietary compounds on intestinal immunity. *Microb. Ecol. Health Dis*, 2000; 2: 146-156.

Rueda R, Sabatel JL, Maldonado J, Gil A. Addition of gangliosides to an adapted milk formula modifies levels of fecal *Escherichia coli* in preterm newborn infants. *J Pediatr*, 1998; 133: 90-94.

Rueda R, Vázquez E, Gil A. Role of dietary gangliosides in early infancy. En: (Bernard F Szujaj, Willem van Nieuwenhuyzen, editors) AOAC Press, Champaign, Illinois. *Nutrition and Biochemistry of phospholipids*, 2003; 10: 101-116.

Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1999; 103: 717-728.

Sampson HA, Sicherer SH, Birnbaum AH. AGA technical review on the evaluation of food allergy in gastrointestinal disorders. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology*, 2001; 120: 1026-1040.

Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113: 805-819.

Sampson HA. Food allergy- accurately identifying clinical reactivity. *Allergy*, 2005; 60: 19-24.

Sanchez de Medina, F. Metabolismo de los aminoácidos. En: (Gil, A, editor) Editorial Grupo Acción Medica. *Tratado de nutrición*. 2005, 1; 14: 455-484.

Sanchez-Pozo A, Rueda R, Fontana L, Gil A. Dietary nucleotides and cell growth. *Trends Comp Biochem Physiol*, 1998; 5: 99-111.

Sarwar G, McDonough FE. Evaluation of protein digestibility-corrected amino acid score method for assessing protein quality of foods. *J Assoc Off Anal Chem*. 1990; 73:347-356.

Sarwar G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. *J Nutr*. 1997;127:758-764.

Savilahti E. Food-induced malabsorption syndromes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000; 30: S61-S66.

Sawatzki G, Georgi G, Kohn G. Pitfalls in the design and manufacture of infant formulae. *Acta Paediatr Suppl*. 1994; 402: 40-45.

Schaller JP, Kuchan MJ, Thomas DL, Cordle CT, Winship TR, Buck RH, Baggs GE, Wheeler JG. Effect of dietary ribonucleotides on infant immune status. Part 1: Humoral responses. *Pediatr Res*, 2004; 56: 883-890.

Sheehy T, Morrissey PA. Tocopherols – Physiology. *Encyclopedia of Human Nutrition*. (MJ Sadler, JJ Strain, B Caballero, editors). London: Academic Press, 1999; 1878-1884.

- Sigurs N, Hattevig G, Kjellman B. Maternal avoidance of eggs, cow's milk and fish during lactation: effect on allergic manifestations, skin-prick tests and specific IgE antibodies in children at age 4 hours. *Pediatrics*, 1992; 89: 735-739.
- Smith DW, Nagler-Anderson C. Preventing intolerance: The induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. *J Immunol*, 2005; 174: 3851-3857.
- Smith JL, Arteaga C, Heymsfield SB. Increased ureagenesis and impaired nitrogen use during infusion of a synthetic amino acid formula. *N Engl J Med*, 1982; 306: 1013-1018.
- Snyderman SE, Boyer A, Holt LE Jr. The arginine requirement of an infant. *J Dis Child*, 1959; 97: 192-195.
- Snyderman SE, Boyer A, Roitman E, Holt LE Jr. The histidine requirements of the infant. *Pediatrics*, 1963; 31: 786-801.
- Solomons NW, Keusch GT. Childhood illnesses, vaccinations, and nutritional status. En: (ME Gershwin, JB German, CL Keen, editors). Totowa, NJ: Humana Press. *Nutrition and Immunology*, 2000: 171-194.
- Stahl B, Thurl S, Zeng J, Karas M, Hillenkamp F, Steup M, Sawatzki G. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-associated laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Anal Biochem*, 1994; 223: 218-226.
- Stone KD. Atopic diseases of childhood. *Curr Opin Pediatr*, 2003; 15:495-511.
- Strober W, Ehrhardt RO. Regulation of IgA cell development. En: (PL Ogra, MD Strober, J Mestecky, JR McGhee, ME Lamn, J Bienenstock, editors). San Diego, CA: Academic Press. *Handbook of Mucosal Immunology*, 1994: 159-176.
- Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol*, 1997; 159:1739-1745.
- Telemo E & Hanson LA. Antibodies in milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1996; 1: 243-249.
- Tessari P, Garibotto G. Interorgan amino acid exchange. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2000; 3: 51-57.
- Terada S, Takizawa M, Yamamoto S, Ezaki O, Itakura H, Akagawa KS. Suppressive mechanism of EPA on human T cell proliferation. *Microbiol Immunol*, 2001; 45: 473-481.

- Teraguchi S, Shin K, Ozawa K, Nakamura S, Fukutawari Y, Tsuyuki S, Namihira H, Shimamura S. Bacteriostatic effect of orally administered bovine lactoferrin on proliferation of *Clostridium* species in the gut mice fed bovine milk. *Appl Environ Microbiol*, 1995; 61: 501-506
- Uauy R, Quan R, Gil A. Nucleotides in infant nutrition. *Nutritional and Biological Significance of Dietary Nucleotides and Nucleic Acids*. (A Gil, R Uauy, editors). Barcelona:Doyma, 1996; 169-180.
- Udall Jn, Colony P, Fritze L, Pang K, Trier JS, Walker JA. Development of the gastrointestinal mucosal barrier. II. The effect of natural versus artificial feeding on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr Res*, 1981; 15: 245-249.
- Van Zijverden M, van der Pijl A, Bol M, van Pinxteren FA, de Haar C, Penninks AH et al. Diesel exhaust, carbon black, and silica particles display distinct Th1/Th2 modulating activity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000; 168: 131-139.
- Vandenplas Y, Hauser B, Blecker U. The nutritional value of a whey hydrolysate formula compared with a whey-predominant formula in healthy infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1993; 17: 92-96.
- Vila L, Beyer K, Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy*, 2001; 31: 1599-1606.
- Von-der-weid T, Bulliard T, Fritsche R. Suppression of specific and bystander IgE responses in a mouse model of oral sensitization to β -lactoglobulin. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001; 125: 307-315.
- Wahn U. Antigens in Cow's Milk and Hen's Egg Allergy. En: (D. Reinhardt, E. Schmidt, editors) *Nestle Nutrition Workshop Series*. New York: Raven Press. *Food Allergy*, 1988; 17: 81-88.
- Wal JM. Cow's milk proteins/allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2002 Dec; 89: 3-10.
- Warner JA, Jones CA, Jones AC, Miles EA, Francis T, Warner JO. Immune responses during pregnancy and the development of allergic disease. *Pediatr Allergy Immunol*, 1997; 8: 5-10.
- Warner JA, Miles EZ, Jones AC, Quint DJ, Colwell BM, Warner JO. Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema?. *Clin Exp Allergy*, 1994; 24: 423-430.
- Weaver LT, Laker MF, Nelson R, Lucas A. Milk feeding and changes in intestinal permeability and morphology in the newborn. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1987; 6: 351-358.

Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nature Rev Immunol*, 2001; 1: 69-75.

Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F et al. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics*. 1999; 58: 1-8.

Wold AE & Adlerberth I. Does breastfeeding affect the infant's immune responsiveness?. *Acta Paediatr*, 1998; 87: 19-22.

Wold AE & Hanson LA. Defense factors in human milk. *Curr Opin Gastroenterol*, 1994; 10: 652-658.

Wright AL. The epidemiology of the atopic child: who is at risk for what? *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113: S2-S7.

Xu D, Lu Q, Deitch EA. Elemental diet-induced bacterial translocation associated with systemic and intestinal immune suppression. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1998; 22: 37-41.

Yau KI, Huang CB, Chen W, Chen SJ, Chou YH, Huang FY, Kua KE, Chen N, McCue M, Alarcón PA, Tressler RL, Comer GM, Baggs G, Merritt RJ, Masor ML. Effect of nucleotides on diarrhea and immune responses in healthy term infants in Taiwan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2003; 36: 37-43.

Yuasa H, Scheinberg DA, Houghton AN. Gangliosides of T lymphocytes: evidence for a role in T-cell activation. *Tissue Antigens*, 1990, 36: 47-56.

Zeiger RS. Food allergen avoidance in the prevention of food allergy in infants and children. *Pediatrics*, 2003; 111: 1662-1671.

Notas

