Departamentos de Pediatria del Hospital Materno Infantil "Virgen de las Nieves" y de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada.

METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEINAS EN RECIEN NACIDOS DE BAJO PESO: INFLUENCIA DE LOS NUCLEOTIDOS DE LA DIETA.

Memoria que presenta el licenciado D. Luis Moltó Ripoll para aspirar al grado de Doctor en Medicina.

Director: Dr. D. Antonio Sánchez Pozo.

Granada, Mayo de 1992.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN Medicina

Curso de 1991 a 1992 Folio 134 vta. Número

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Luis Fidel Multo Ripoll, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: Metabolismo de las lipoproteínas en recién nacidos de bajo peso. Influencia de los nucleótidos de la dieta.

Terminada la lectura y contestadas la objecciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este le calificó de Apto cum laudem por unanimidad

Granada 25 de Junio de 1992

EL PRESIDENTE,

Fdo.: J. A. Molina Font

El Secretario del Tribunal,

Fdo.: Jesús Moreno Martín

EL VOCAL,

Fdo.: F. Sánchez Medina

EL VOCAL,

Fdo.: D. Martínez Valverde

EL VOCAL,

Fdo.: R. Jiménez

FIRMA DEL GRADUANDO,

Luis Fidel Multó Ripoll

Antonio Sánchez Pozo, Doctor en Farmacia y Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que D. Luis Moltó Ripoll ha realizado el trabajo de investigación titulado: "Metabolismo de las lipoproteínas en recién nacidos de bajo peso. Influencia de los nucleótidos de la dieta", bajo mi dirección, y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

De acuerdo a la normativa vigente, me complace informar favorablemente la presentación de esta Tesis doctoral ante el tribunal que se designe.

Granada, Mayo de 1992.

A Maritina.

A mis hijos.

A mis padres.

Parte de los resultados de esta memoria fueron presentados en la XIII Reunión Nacional de Medicina Perinatal, Tenerife (1991).

En parte, también, han sido aceptados para su publicación en Acta Pediátrica Scandinavica (1992).

Indice

página

I. Introducción 9

II. Objetivos y plan de trabajo 53

III. Material y métodos 57

1.-Sujetos 58

2.-Dietas 59

3.-Muestras 61

4.-Métodos de laboratorio 61

Ultracentrifugación de lipoproteínas 61

Estudio electroforético de lipoproteínas aisladas 63

Caracterización de Apolipoproteínas 63

Determinación cuantitativa de apolipoproteínas . 65

Determinación de Colesterol 65

Determinación de triglicéridos 66

Determinación de fosfolípidos 66

Microscopia electrónica 66

Determinación de Proteínas 66

Separación de proteínas plasmáticas 67

Determinación de Urea 68

Determinación de ácido úrico 68

Determinación de Glucosa 69

5.-Análisis estadístico 69

IV. Resultados 70

Indice

1.-Cambios en los niveles totales de colesterol y lipoproteínas 71
Colesterol plasmático 71
Distribución del colesterol entre las fracciones lipoprotéicas 71
Concentración de lipoproteínas 71
2.-Cambios en la composición de las lipoproteínas . 78
Niveles de triglicéridos 78
Niveles de colesterol 79
Concentración relativa de colesterol esterificado 79
Concentración y composición de apolipoproteínas 87
Apolipoproteínas totales 87
Composición protéica 87
3.-Efecto de los nucleótidos 95
4.-Otras determinaciones complementarias 106
V. Discusión 113
1.-Cambios en las lipoproteínas plasmáticas durante el periodo postnatal temprano 114
Cambios en las VLDL 115
Cambios en las LDL 117
Cambios en las HDL 118
2.-Efecto de los nucleótidos sobre el metabolismo neonatal de las lipoproteínas 123
VI. Conclusiones 127
VII. Agradecimientos 130
VIII. Bibliografía 133

AMP: Adenosín monofosfato.

APO: Apolipoproteína.

B.P.: Bajo Peso

CE: Colesterol esterificado.

CETP: Proteína transportadora de colesterol esterificado.

CIR: Crecimiento intrauterino retardado.

CMP: Citidín monofosfato.

CL: Colesterol no esterificado (libre).

CT: Colesterol total.

DS: Desviación estándar.

EDTA: Acido etilén diamino tetraacético.

ESPGAN: European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.

FL: Fosfolípidos.

GMP: Guanosín monofosfato.

HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

HTGL: Lipoproteína lipasa hepática.

IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia.

IMP: Inosín monofosfato.

LCAT: Lecitina colesterol acil transferasa.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

LPL: Lipoproteína lipasa.

MCT: Triglicéridos de cadena media.

PAGE: Electroforésis en gel de poliacrilamida.

QM: Quilomicrón.

RN: Recién nacido.

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina

TG: Triglicéridos.

TRIS: Hidroxi-metil-amino-metano.

UMP: Uridín monofosfato.

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

I.- INTRODUCCION

El fin primordial de la Pediatría es el estudio del crecimiento, que podría definirse, de forma muy simple, como una integración de la diferenciación celular, hiperplasia e hipertrofia, que conduce a la madurez estructural y funcional característica del individuo adulto.

De entre los muchos aspectos de la adaptación del neonato, el transporte de lípidos plasmáticos, esto es, el sistema de las lipoproteinas, es de gran importancia dado el brusco cambio en la nutrición que tiene lugar tras el nacimiento y la importancia de las grasas en la homeostasis energética.

La relación nutrición-crecimiento, aunque ha sido objeto de gran atención desde muy antiguo, es un área de constante investigación. Se ha avanzado mucho en el conocimiento de los efectos de los así llamados *"macronutrientes"*, como proteínas, lípidos, etc. pero aún es poco conocido el de los *"micronutrientes"*, como los nucleótidos, a cuyo estudio se dedica nuestro grupo de investigación.

Los neonatos de bajo peso presentan necesidades diferentes y su estudio está aún muy retrasado tanto en el aspecto de los cambios adaptativos neonatales como en el de la nutrición.

Clasificación de los recién nacidos.

Se han venido clasificando según el peso del nacimiento, edad gestacional y según estándar de crecimiento intrauterino (Silverman, 1967). Tras los trabajos de Gruenwald, Battaglia y Lubchenco y el 2º Congreso Europeo de Medicina Perinatal (Londres, 1970) se dividieron según criterio cronológico en pretérmino, atérmino y postérmino, según fueran nacidos antes de la 37 semanas de gestación, entre 37 y 42 semanas de gestación, y después de las 42 semanas de gestación, y cada grupo se subdividió en tres apartados, teniendo en cuenta el peso al nacimiento. Peso adecuado cuando el peso queda comprendido entre el 10 y 90 percentil, bajo peso, si el peso es inferior al percentil 10 y, peso elevado cuando está por encima del percentil 90 en las primeras curvas del crecimiento intrauterino de la Escuela de Denver.

Metabolismo perinatal de las lipoproteínas.

El metabolismo neonatal de las lipoproteínas es poco conocido. Recientemente se le está prestando gran atención ya que puede ser de gran ayuda al diagnóstico precoz de dislipemias. Para muchos autores, los valores de colesterol LDL durante la infancia son predictivos de los que va a tener el individuo en la etapa adulta (Laskarzewski et al., 1979; Clarke et al., 1978; Webber et al., 1983; Orchard et al., 1983; Freedman et al., 1985; Mellies

et al., 1985). Aunque con discrepancias (Glueck y Tsang, 1979; Hardell, 1981), cada vez hay más evidencia de la correlación entre la génesis del ateroma y la cantidad de colesterol durante la infancia (Newman et al., 1986; McHill, 1963). Los efectos de la dieta durante este periodo parecen tener transcendencia. Estudios en animales, han sugerido si son alimentados con dietas ricas en colesterol, durante la fase neonatal, son capaces de controlar mejor los niveles en la fase adulta (Reiser y Sidelman, 1972; Mott et al., 1985). Sin embargo, en humanos, no se ha podido confirmar (Friedman y Goldberg, 1974; Huttunen et al., 1983; Fomon et al., 1984). En varios estudios (Farris et al., 1982; Glueck et al., 1972), se ha demostrado que los niños alimentados con leche de vaca (rica en colesterol) tenian más LDL a la edad de 6 meses pero no a la de 1 año. Con independencia de su posible valor para el diagnóstico de dislipemias, la evolución del metabolismo de las lipoproteinas es fascinante.

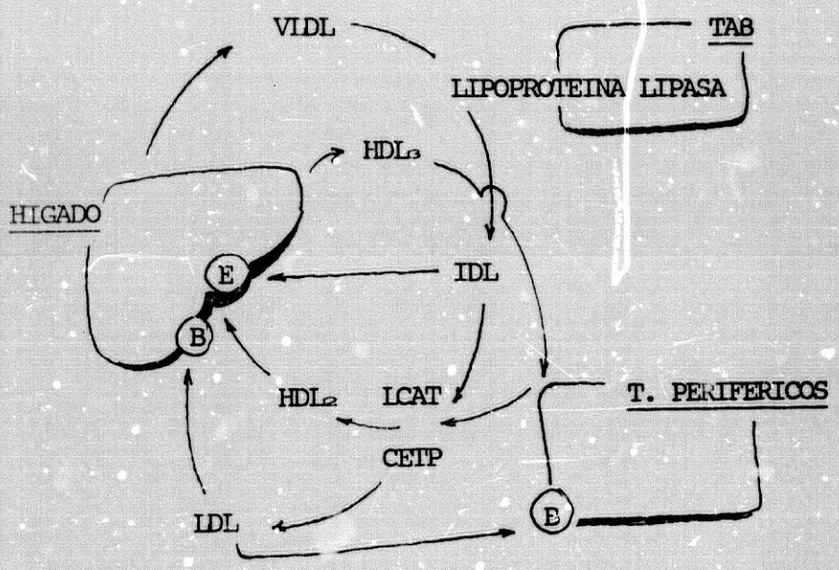

Figura nº 1.- Esquema del metabolismo de las lipoproteínas. TAB: Tejido adiposo blanco. Las letras en círculos representan los receptores para las apoproteínas B_{100} y E. LCAT: Lecitina-colesterol aciltransferasa. CETP: Proteína transportadora del colesterol esterificado.

Metabolismo fetal de las lipoproteínas.

La mayoría de los datos de que se dispone han sido obtenidos de sangre del cordón umbilical de recién nacidos preterminales. De ahí su interés en nuestro estudio. Los niveles de lipoproteínas circulantes durante la etapa fetal son bajos dado que el feto no recibe mucha grasa de la madre. Para algunos autores no existe transporte a través de la placenta (Fredrickson y Breslow, 1973; Diczfalusy, 1974; Hahn, 1972). Para otros, un porcentage significativo del colesterol fetal proviene de la madre (Lin, 1977; Knoop et al., 1981). Estudios realizados en trofoblastos humanos obtenidos de la placenta y cultivados "in vitro", indican que estos captan HDL eficientemente. La captación es muy superior a las necesidades de colesterol para la sintesis de hormonas (ejem. progesterona), de modo que cabe pensar que el colesterol pase al feto (Knoop, 1981). En opinión de Biezennski (Biezenski, 1975) y Khamsi (Khamsi et al., 1972) los ácidos grasos y el colesterol no esterificado son transferidos a través de la placenta, al menos, al final del embarazo. En cualquier caso, el paso de lipoproteínas intactas parece poco probable. Los ácidos grasos que entran en la circulación fetal desde la madre son incorporados en el hígado al glicerol y transportados como lipoproteínas (Hudson et al., 1977). No hay datos acerca del la posible contribución del intestino aunque cabe esperar que su papel sea muy escaso.

El hígado del feto es capaz de sintetizar ciertas proteínas desde las 16ª semana de gestación (Dancis et al., 1957), por lo que no resulta extraño que el feto sintetize sus propias lipoproteínas. La síntesis de apo A-I y seguramente de las demás apolipoproteínas aumenta durante la gestación (Parker et al., 1988), pero el ritmo de síntesis es diferente para cada apolipoproteína. Así, al final de la gestación, las apos C-I, C-II y E presentan valores similares a adultos, mientras que apo B, D y C-III están muy disminuidas. La apo A-I y A-II suponen un 50-60 % de las encontradas en adultos y la apo F no es detectable (Lane y McConathy, 1986; McConathy y Lane, 1980; Stozicky et al., 1982). La presencia de alta concentración de apo C-II asegura el funcionamiento de la LPL. La apo C-II es el cofactor de la LPL (Havel et al., 1970). De igual forma, la alta concentración de apo E, la cual es reconocida por los receptores B,E muy eficientemente, asegura la entrada de las partículas en los tejidos (Bradley et al., 1984) ya que el funcionamiento de los receptores es normal. Todos estos datos indican que la capacidad de transportar y utilizar lípidos en el feto es tan buena como en adultos. Lo cual es lógico teniendo en cuenta que los tejidos en crecimiento necesitan del aporte de lípidos: acidos grasos y colesterol.

Los receptores lipoproteicos celulares y las enzimas del metabolismo lipoproteico son funcionales en el feto. Así, la captación de LDL por diversos tejidos es completamente funcional

desde principios de la gestación (Andersen y Johansen, 1980; Brown et al., 1978). Aunque no se conocen los cambios durante la gestación, la actividad LPL es similar a la de adultos, (Rovamo et al., 1984; Andrew et al., 1978; Dhanireddy et al., 1981; Shennan et al., 1977; Zaidan et al., 1982). La actividad HTGL hepática es mucho mayor que la LPL. La actividad del enzima LCAT aumenta durante la gestación (Jain, 1985) lo que da cuenta del aumento progresivo del cociente CE/CL (Díaz et al., 1989; Andersen et al., 1977, 1979; Ginsburg y Zeetterström, 1980), siendo menor que la del adulto en todo momento (Lacko, 1972; Klimov et al., 1978; Dobiasova et al., 1984; Jain, 1985). No obstante, esta actividad parece ser suficiente ya que no se han observado formas discoides de HDL típicas de su deficiencia (Forte et al., 1982).

La escasa cantidad de LDL parece deberse a un rapidísimo turnover de estas partículas. Existe evidencia de una menor cantidad de LDL, pero no de HDL entre las 33 y las 42 semanas de gestación. La caida de LDL se explica por la utilización de estas por los adrenes para hacer hormonas esteroides, necesarias para el crecimiento. Durante las últimas 10 semanas de gestación, la producción de estas hormonas y el crecimiento son unas 100 veces mayor que en el adulto (Davis y Forte, 1982). Una prueba de la validez de esta hipótesis es que en niños con anencefalia, en que la glándula adrenal está atrofiada, los niveles de LDL al nacimiento son muy elevados (Parker et al., 1983). Para Parker, otras situaciones de estres fetal como diabetes e hipertensión

materna también pueden originar una producción disminuida de esteroides por lo que al nacer, suelen ser niños hipercolesterolémicos (Cress et al., 1977). Tras el nacimiento la captación de LDL por los adrenes disminuye, incluso cambia morfológicamente la glándula, con pérdida de una zona fetal del tejido (Bloch, 1968), lo que explicaría el aumento progresivo de esta partícula.

Las HDL son la fracción predominante (Davis et al., 1983; Ginsburg y Zetterström, 1977; Winkler et al., 1977; McConathy y Lane, 1980). Davis (Davis et al., 1983) ha descrito que las HDL de cordón difieren en tamaño y composición, así como en la distribución de densidad de las de adultos. Las subfracciones de HDL son más heterogéneas (Blanche et al., 1981) y se distinguen tres subclases en electroforésis en gradiente: HDL_{2a}, HDL_{2b} y HDL_3 (Genzel-Boroviczeny et al., 1986). La fracción HDL_{2b} es la principal con un alto contenido en fosfolípidos lo que le confiere una forma diferente de las de adultos. No se observan formas discoides (Forte et al., 1982).

Las VLDL están en cantidades traza y las LDL están marcadamente disminuidas (Cress et al., 1974; Carlson y Hardell, 1977). La composición, aunque se asemeja a la de adultos es particularmente diferente. La relación proteína/lípido de VLDL es mayor, pero el tamaño es el mismo, pareciéndose a las IDL de los adultos (Winkler et al., 1977; Skinner et al., 1983). Las LDL

contienen una relación de FL/CT muy grande y sin embargo poseen el mismo tamaño gracias al alto contenido en TG. Lo más llamativo es que poseen además de apo B, apo E y C como las IDL de adultos (Davis y Forte, 1982). Estos datos sugieren que, prescindiendo de las consideraciones de densidad que hacen posible separar fracciones similares a las de adultos, la situación en el feto podría definirse, en cuanto a este grupo de lipoproteínas, como constituida por partículas tipo IDL heterogéneas.

El alto contenido en TG de las LDL puede explicarse porque en el feto la mayor parte de las necesidades energéticas se suplen con azúcares y por lo tanto la lipolisis debe ser baja (Ginsberg et al., 1981). La gran cantidad de proteína en VLDL parece reflejar la escasa cantidad de triglicéridos disponibles en el hígado como consecuencia de la dieta. Otra explicación a la alta cantidad de TG, puede ser el rápido turnover de las LDL que no permite el normal intercambio de componentes con las HDL. Niveles altos de TG también se observan en pacientes con deficiencia de LCAT en donde dicha transferencia está bloqueada. Un interesante aspecto observado en microscopía electrónica por Forte (Forte et al., 1982) es que muchas de las LDL de cordón presentan caras aplastadas en lugar de esféricas. Partículas similares se han observado en homozigotos de hipercolesterolemia familiar (Agostini et al., 1973). No se conoce el origen de estas partículas aunque podrian interpretarse como que las pocas LDL del cordón son en

realidad LDL modificadas que no son reconocibles por el receptor B,E.

Metabolismo neonatal de las lipoproteínas.

Los niveles de lipoproteínas aumentan progresivamente desde el nacimiento. Aunque el aumento en colesterol continúa durante toda la vida, el mayor aumento de los lípidos tiene lugar durante el primer més de vida (casi el 100 %). Durante el primer año de vida el aumento es mucho menor, y entre el primer y el décimo año de vida el incremento es de solo un 10-15 % (Darmady et al., 1972; Andersen et al., 1979; Wiese et al., 1966).

Durante las primeras 8 horas de vida, no se han observado aumentos en las VLDL ni en las LDL, a pesar de que los àcidos grasos circulantes lo hacen muy significativamente. Inmediatamente después del parto se produce una elevación de los ácidos grasos plasmáticos (Persson y Tunell, 1971). Durante ese periodo, el recién nacido utiliza en primer lugar las reservas de glucógeno, formadas en las últimas etapas de la vida fetal. Estas reservas se agotan rápidamente al tiempo que se pone en marcha la gluconeogénesis. Mientras los niveles de glucosa son bajos, el neonato recurre a la utilización de ácidos grasos y compuestos cetónicos como fuente energética movilizando las reservas del tejido adiposo. El aumento de acidos grasos es observable dos horas después del parto, luego desciende y de nuevo se eleva 12

horas tras el nacimiento (Christensen, 1974). El primer aumento parece producirse en respuesta al frio, así, cuando se evita la hipotermia desaparece (Pribylova y Rylander, 1972), el segundo, y más importante, como respuesta a la falta de glucosa antes mencionada, ya que la infusión de glucosa o aminoácidos lo elimina (Rubecz y Mestyan, 1973). Gustafson (Gustafson et al., 1972) ha encontrado que la administración de Intralipid, una emulsión artificial de grasa, origina la aparición de VLDL rápidamente, ello hace suponer que los ácidos grasos que se movilizan inmediatamente tras el nacimiento, son consumidos rápidamente y no es hasta que se instaura la dieta cuando aumentan las lipoproteínas.

La evolución de las lipoproteínas durante los primeros dias tras el nacimiento es diferente según se trate de HDL o de VLDL-LDL. La razón para el distinto comportamiento de HDL y VLDL tiene su origen en el distinto papel de estas, las primeras como distribuidoras de colesterol y las segundas como suministradoras de ácidos grasos. En neonatos la fracción HDL es la predominante, esta fracción apenas se modifica durante la primera semana para aumentar después alcanzando valores similares a los de adultos al final del primer més de vida (Strobl et al., 1983). Para Lane (Lane y McConathy, 1986) las HDL y apo A-1 aumentan 2 veces desde el dia 5-7 al 14 en que presentan el máximo (el nivel es superior a adultos) y descienden algo hasta el 21-30 en que los niveles son similares (80%) a adultos (Alaupovic, 1983). Para otros autores,

sin embargo Apo A-I y Apo A-II que representan alrededor del 70% de los valores de adultos, aumentan durante los dias 7-30 (Van Biervliet et al., 1986). La apo A-IV aumenta 3 veces en los primeros 6 dias (Steimetz et al., 1988). Puesto que la apo A-IV es de origen intestinal, cabe pensar que este aumento se debe al efecto ejercido por la instauración de la alimentación. VLDL, LDL y apoproteína B y C-III se incrementan durante la primera semana y ya permanecen estacionarios desde entonces hasta el més de vida. Los valores son el 50% de los encontrados en adultos (Van Biervliet et al., 1981). Los bajos niveles de VLDL representan una mala movilización de vitamina E del recién nacido (Desai et al., 1984). Las VLDL aumentan 5 veces, mientras que las LDL solo 3 veces (Kirstein et al., 1985, Van Biervliet, 1981). En el neonato las frecuentes tomas de alimento probablemente inhiban la actividad lipolítica siendo almacenados los lípidos.

La actividad LPL es similar a la de adultos (Rovamo et al., 1984; Högstedt y Lindquist, 1963). La actividad HTGL es muy alta en recién nacidos (tres veces la de la LPL) (Rovamo et al., 1984; 1984). Sin embargo, a la vista de la evolución de las lipoproteínas, Van Biervliet afirma que está reducida durante la primera semana de vida, así lo sugiere el mayor aumento de VLDL que de LDL (Van Bierlviet et al., 1986) aunque puede haber otras razones para estos cambios.

La actividad del enzima LCAT es baja en el recién nacido (Lacko et al., 1972; Klimov et al., 1978; Dobiasova et al., 1984) y aumenta en los primeros dias de vida, pero nunca sobrepasa el 50% de la actividad de un adulto (Lane y McConathy, 1986; Curnow y Crawford, 1972). En todo caso parece ser suficiente ya que no se observan diferencias con los adultos en el cociente CE/CL (Pocovi et al., 1983). Cisternas (Cisternas et al., 1979) encontró que la actividad LCAT desciende en el segundo dia seguido de un ascenso al quinto dia. Estos cambios se traducen en el cociente CE/CL que aumenta a partir del 5º dia. La evolución es similar en la rata (Lane y McConathy, 1983, 1986). En su opinión y en la de Harkness (Harkness et al., 1973), pudiera tratarse de que la LCAT proceda de la madre y solo tras 4-5 dias empiece el hígado del neonato a sintetizarla. La transferencia de proteínas ligadas a HDL ha sido demostrada por Robertson (Robertson y Sprecher, 1968) y la LCAT se asocia a las HDL, en realidad forma un complejo con ellas (Glomset, 1968). Esta hipótesis, aunque atractiva, no ha podido ser demostrada.

Todas las lipoproteínas están enriquecidas en fosfolípidos (Van Biervliet et al., 1986). En términos de porcentajes, las VLDL pasan de tener un 48% de TG, 33% FL y 18% CT, en el neonato a 62% TG, 22% FL, 15% CT a los 30 dias, lo cual supone un aumento de TG. En las LDL se observa un descenso de TG solamente. Estos cambios sugieren que el neonato comienza a hacer verdaderas VLDL y LDL frente a las IDL fetales. Las VLDL de neonatos tienen una relación

frente a las IDL fetales. Las VLDL de neonatos tienen una relación CE/TG mayor que en adultos, pareciéndose más a las IDL que a las VLDL de adultos lo cual puede tener relación con una escasa transferencia con otras fracciones. Rosseneu (Rosseneu et al., 1983) y Davis (Davis y Forte, 1982) han descrito una gran cantidad de IDL ricas en esteres de colesterol al nacimiento que van desapareciendo con el tiempo a la vez que aumentan las VLDL. Estas partículas son muy ricas en apo B, comparadas con adultos, lo que sugiere que durante la infancia la formación de VLDL se hace con pocos TG, bién porque estos estan siendo captados por los tejidos rápidamente, o bién porque en estos momentos los QM son los predominantes dada la elevada frecuencia de alimentación del neonato.

A lo largo de estos primeros dias de vida se han observado cambios en la distribución de las apolipoproteínas entre las fracciones. La Apo E, cuya concentración es similar a adultos, se encuentra principalmente en las HDL al nacimiento. Esta fracción de HDL-E, rica también en apo A-II, disminuye con la edad, a la vez que aumenta la apo E en VLDL (Van Biervliet et al., 1986). En opinión de algunos autores se puede pensar en vías específicas durante la fase neonatal, así Innerarity (Innerarity et al., 1984) ha sugerido que la HDL-E puede llevar colesterol a los tejidos tanto como las LDL en adultos. Conforme las VLDL, sintesis y catabolismo aumentan, esta fracción pierde importancia. La presencia de HDL-E es similar a lo descrito en casos de

abetalipoproteínemia y refleja la necesidad de llevar colesterol en situaciones donde las IDL son escasas.

Los cambios anteriormente descritos, se han interpretado como la consecuencia de la alimentación, que inicia el catabolismo de las lipoproteínas ricas en TG (Van Biervliet et al., 1980, 1981; Davis y Forte, 1982; Kirstein et al., 1985). Para otros autores (Zee, 1975; Biezenski, 1975), sin embargo, estos primeros cambios en las lipoproteínas plasmáticas no tienen relación con la introducción de la grasa en la dieta y deben ser consecuencia de la adaptación del neonato. Melichar ha indicado, sorprendentemente, que la absorción de grasa intestinal no ocurre hasta 4-6 dias tras el parto (Melichar et al., 1962), cosa que parece poco probable ya que el neonato, incluso si es prematuro, puede tolerar muy bien dietas ricas en grasa (Hammer et al., 1982). La fracción HDL, que constituye un factor protector frente a la aterosclerosis, se mantiene relativamente estable a lo largo de la vida (Tsang et al., 1981) indicando que se trata de un sistema independiente en cuanto a su evolución del VLDL-IDL.

Metabolismo de las lipoproteínas en neonatos de bajo peso.

Muchos son los factores que pueden influir en los niveles de lípidos en el neonato (Andersen, 1976; Cress, 1977; Tsang et al., 1974; Lane y McConathy, 1983). El peso y la edad gestacional

ejercen un efecto muy significativo. La mayoría de los datos disponibles corresponden al momento del nacimiento.

Varios autores han descrito que los niveles de colesterol son mayores y los de triglicéridos menores en prematuros (Andersen, 1981, 1978; Christensen, 1977; Cress et al., 1977; Fosbrooke y Wharton, 1973; Ginsburg y Zetterström, 1980; Hardell, 1981; Lane y McConathy, 1983; Martinsen et al., 1981; Parker et al., 1980). Los niveles de colesterol no esterificado y HDL en prematuros (32-36 semanas de gestación) y pequeños para la edad gestacional son menores que en los normales a término. Asimismo, la relación CE/CL es menor en prematuros que en neonatos a término (Díaz et al., 1989; Andersen et al., 1977, 1979; Ginsburg y Zetterström, 1980). Jain (Jain, 1985), ha encontrado que los prematuros son deficientes en LCAT, lo que daría cuenta de los menores niveles de colesterol esterificado. Genzel-Boroviczney [1986] describe diferentes perfiles de HDL según si hay hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia. En el primer caso, asociado normalmente a prematuridad, se observa una gran cantidad de HDL_{2a}; mientras que en el segundo, asociado a alteraciones perinatales una gran cantidad de HDL_3. Estos cambios se han interpretado com el resultado de la transferencia de CE desde las HDL_2 a las VLDL. Así, en el primer caso al no haber TG no hay transferencia.

En recién nacidos de menos de 32 semanas se han observado mayores niveles de LDL. Estos no son el resultado de una escasa captación de estas partículas ya que los receptores LDL estan completamente desarrollados en prematuros y no difieren de los nacidos a término (Andersen et al., 1980). La explicación más plausible es que se deban a la menor actividad esteroidogénica de los adrenes (y crecimiento) que como se sabe, tiene un gran desarrollo al final de la gestación.

De acuerdo con la evolución de los lípidos durante la etapa fetal, los TG estan disminuidos en los prematuros y elevados en niños de más de 4 KG al nacer. En niños con insuficiencia placentaria, parto prolongado, patología funicular, valores bajos del test de Apgar y otras complicaciones perinatales los triglicéridos están elevados (Tsang et al., 1974; Cress et al., 1977). En preterminales que sufren distres respiratorio los niveles de TG y colesterol están disminuidos lo que conlleva una escasa formación de surfactante pulmonar.

En relación a la evolución de las lipoproteínas durante los primeros dias tras el nacimiento en niños de bajo peso, hay pocos datos. La actividad LPL postheparínica en prematuros es para algunos autores menor que en normales, de modo que el metabolismo de las lipoproteínas ricas en TG es lento (Andrew et al., 1978; Dnamireddy, 1981; Shennan et al., 1977; Zaidan et al., 1982). Rovamo [1984], sin embargo, ha indicado que la actividad LPL es

incluso mayor que en los a término aunque la utilización de la grasa es lenta. Otros factores como la menor masa del tejido adiposo pueden ser los responsables. La presencia de hiperinsulinemia en el prematuro justifica la mayor actividad LPL de acuerdo con el conocido efecto activador de la hormona (Nilsson-Ehle, 1982).

Los recién nacidos de bajo peso, prematuros o no, tienen un menor tejido adiposo, este se desarrolla durante el último trimestre (Hahn, 1972; Hull, 1874), por lo que lógicamente la movilización de grasas, inmediatamente después del nacimiento, es menor que en los normales (Harris, 1974; Melichar y Wolf, 1967). Aunque, el hígado de los prematuros posee la capacidad de hacer VLDL, esta depende del aflujo de ácidos grasos (Gustavson, 1974). El menor aflujo de estos explica los menores niveles de VLDL. En prematuros (29-37 semanas gestación), Christensen señala que los ácidos grasos son dependientes de la edad gestacional pero no así el glicerol o los triglicéridos (Christensen, 1981). Melichar [1967] encontró menores concentraciones de ácidos grasos y mayores de glicerol durante las primeras horas en los niños pequeños. Esta situación puede interpretarse como resultado de una activa lipolisis de las lipoproteínas con una menor liberación de ácidos grasos. Los niveles de ácidos grasos en plasma dependen de la cantidad de albúmina por lo que en prematuros cabe esperarse menor transporte. Por otra parte, la eliminación de glicerol en prematuros es menor que en los normales y pequeños para la edad

gestacional (Melichar y Wolf, 1968). Ginsburg [1980] ha descrito que a los 3-4 dias del nacimiento, los niveles de colesterol en normales y prematuros son similares (3 mM/L) lo que indica que el aumento fue mayor para los normales que para los prematuros. Decsi (Decsi et al., 1990) han estudiado la evolución de los lípidos séricos en neonatos de muy bajo peso observando una evolución similar a los normales.

Nosotros (Pita et al., 1984) hemos observado que a los 7 dias de edad los niños pequeños presentan valores muy altos de colesterol y triglicéridos sin que ello se traduzca en una alteración de los porcentajes de las fracciones lipoproteicas, lo que sugiere un enriquecimiento en lípidos en las partículas.

Nutrición del neonato de bajo peso.

En el caso de los neonatos de bajo peso, se discute actualmente si la leche materna es suficiente para sus especiales necesidades (Gordon et al., 1947; Senterre et al., 1984). Hay que tener en cuenta que las necesidades de crecimiento de estos niños son superiores a las de los normales. En cualquier caso, el empleo de fórmulas lácteas específicas está dando buenos resultados.

El bajo peso al nacimiento, frecuentemente, obedece al parto prematuro, dado que el crecimiento entre las semanas 30 a la 37 de gestación es mayor que en cualquier otra etapa fetal. Otra

causa de bajo peso es el retraso del crecimiento intrauterino, el cual puede ser debido a diversos factores. Al menos un 60% de las variaciones del peso al nacer se deben a factores "ambientales" y solo una pequeña proporción a factores genéticos (Robinson et al., 1985). La malnutrición intrauterina, bien sea por un menor flujo sanguíneo en la placenta o por malnutrición materna, es la causa más frecuente dentro de los factores ambientales. En efecto muchos neonatos de bajo peso presentan signos de malnutrición: menor depósito de grasa subcutánea y tejido adiposo (Hill et al., 1984; Mettau et al., 1977); menor desarrollo antropométrico y ponderal (Walther et al., 1982, Miller y Hassanein, 1971; Georgieff et al., 1986); mayor excreción de 3-metil histidina y cambios en los aminogramas plasmáticos y urinarios característicos además de una menor concentración de proteínas séricas (Faus et al., 1984); menor cantidad de proteína fijadora del retinol (Howells et al., 1983), etc. En general, un tercio de los recién nacidos de bajo peso son niños con retraso del crecimiento intrauterino. En nuestro Servicio el número de prematuros y CIR durante los últimos años se indica en la tabla nº 1.

Tabla nº1.- Recién nacidos en el centro materno-infantil de Granada.

	NACIDOS	B.P.	PREM.	CIR
1989	5.219	291	271	70
1990	5.243	238	287	106
1991	5.169	328	260	105

Los neonatos de bajo peso presentan problemas nutricionales y metabólicos específicos durante la fase neonatal. Los problemas metabólicos consecuencia del retraso del crecimiento o de la prematuridad incluyen: hipoglucemia, hipocetonemia. El neonato normal a término mantiene la normoglucemia en el periodo de ayuno postnatal gracias a la glucogenolisis y a la gluconeogénesis. En el neonato de bajo peso existe una menor reserva de glucógeno y una menor actividad gluconeogénica debido en buena parte a la mayor utilización de precursores gluconeogénicos con otros fines (Hay, 1984). Dado que la gluconeogénesis se desarrolla al final de la gestación (Silver, 1976) el mantenimiento de la glucemia se agrava en los neonatos muy inmaduros. En los neonatos de bajo peso la hipocetonemia (Haymond et al., 1974), parece ser debida a la reducida lipolisis por tener menor cantidad de tejido adiposo y a la menor oxidación de ácidos grasos en el hígado debido, entre otros factores, al déficit de carnitina (Sabel et al., 1982).

En el neonato con malnutrición el metabolismo es más elevado que en el neonato normal, probablemente como consecuencia de la tendencia a compensar su deficiente crecimiento fetal y equipararse con el normal tras el nacimiento (Fitzhardinge y Steven, 1972; Davies, 1981; Walther y Ramaekers, 1982; Ounsted et al., 1982; Davis et al., 1976). Así la síntesis de proteínas y grasas es muy alta (Pencharz et al., 1981) y el consumo de oxígeno también (Chessex et al., 1984). En particular, el cerebro muestra una elevada actividad durante el periodo neonatal y necesita de gran aporte de nutrientes (Holliday, 1971; Chessex et al., 1984). La anteriormente descrita hipoglucemia e hipocetonemia son pues muy peligrosas para el normal desarrollo cerebral y justifican que se instaure rápidamente su alimentación tras el nacimiento.

Con relación al metabolismo de los ácidos grasos, se conoce que las actividades enzimáticas de elongación y desaturación son muy tardías en la gestación (Clandinin y Chappell, 1985) lo que determina una mayor necesidad de ácidos grasos esenciales.

El neonato y especialmente el de bajo peso presentan una menor capacidad digestiva que el adulto. Se han descrito buen número de limitaciones tales como disminución de la función del esfinter del esófago, disminución del vaciado gástrico e intestinal etc. Con relación al metabolismo se ha observado un retraso en el desarrollo del intestino con déficit de enzimas: lactasa (Boellner et al., 1965), enteropeptidasas (Hamosh, 1982)

etc. Además, el flujo sanguíneo intestinal suele estar reducido como consecuencia de la hiperviscosidad, la cual es el resultado de la policitemia que aparece en respuesta a la hipoxia del nacimiento (Bard, 1978; Humbert et al., 1969; Black y Lubchenco, 1982). Existe una menor secreción de enzimas pancreáticas siendo especialmente bajo el nivel de lipasa (Lebenthal et al., 1980; 1981; Stransky y Davis-Laws, 1950; Zoppi et al., 1972) y amilasa (Aurichio et al., 1965). Es interesante destacar que la lipasa lingual aumenta tras el nacimiento, y asimismo, que la leche humana contiene lipasa (Hotzapple et al., 1975) las cuales parecen ayudar la limitada capacidad del neonato para la digestión de la grasa. La síntesis de ácidos biliares así como su reciclaje son menores en el neonato de bajo peso que en el neonato normal (Watkins et al., 1975; Jarvenpaa, 1983). El hígado muestra deficit de ciertas enzimas como la cistationasa (Sturman et al., 1970) o la p-hidroxifenilpiruvato oxigenasa y en general deficit en el metabolismo de los aminoácidos sulfurados por lo que es conveniente añadir taurina y posiblemente cisteína (Rassin et al., 1978). Por tanto, el neonato muestra intolerancia a la alimentación que dificulta la pronta normalización de su hipoglucemia. Por otra parte, el desarrollc gastrointestinal requiere de la instauración de la alimentación enteral (Aynsley-Green, 1985) de modo que se suele recomendar una adaptación progresiva a la nutrición.

Comparativamente, los neonatos con crecimiento intrauterino retardado con respecto a los prematuros se caracterizan: a) por una menor capacidad de absorción de proteínas (Penchraz et al., 1981) y grasas (Viteri et al., 1973), lo cual lleva aparejado una menor absorción de calcio con resultado de un menor crecimiento del hueso (Tantibhedhhyangkul y Hashim, 1975, 1978). La absorción de carbohidratos tambien parece ser menor (MacLean y Fink, 1980), si bien no se ha podido detectar una mayor excreción fecal dado que son transformados rápidamente en ácidos volátiles por la flora intestinal (Bond y Levitt, 1976); b) por un mayor turnover proteico que indica una adaptación a la menor absorción proteica (Picou y Taylor-Roberts, 1969); c) una mayor capacidad oxidativa de los ácidos grasos a la vez que una peor utilización de los triglicéridos (Andrew et al., 1976; Stahl et al., 1986; De Leeuw et al., 1985; Shennan et al., 1977).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, las fórmulas para neonatos de bajo peso son diferentes de las del neonato normal (American Academy of Pediatrics, Nutrition Committee; ESPGAN Committee). Las modificaciones que se han ido introduciendo en los últimos años: se ha incrementado el aporte calórico, se ha incrementado la cantidad de proteína y la relación proteínas del lactosuero/caseina de modo que sea más digerible y evitar la aparición de enterocolitis necrosante, se han modificado el tipo de grasa incorporando triglicéridos de cadena media para favorecer la digestión y absorción, asi como para aumentar los niveles de

linoleico y/o vitamina E para evitar anemia hemolítica, se ha reducido el contenido en electrolitos a fin de evitar el estrés en riñones inmaduros aunque se ha elevado el aporte de fosfatos, se ha reducido el contenido en lactosa lo que a su vez incide en una mejor absorción de minerales, etc.

Nucleótidos y nutrición del neonato.

Los nucleótidos presentes en los tejidos proceden: bien de la síntesis *"de novo"*, o bien del sistema de recuperación de bases, siendo este último muy activo en todos los tejidos, ya que es menos costoso que el primero. En mamíferos la recuperación de bases pirimidínicas es baja comparada a la de bases púricas (Joes, 1980). La via de recuperación es el camino por donde se canaliza la incorporación de los nucleótidos de la dieta (figura nº2).

etabolismo de los nucleótidos.

No se ha detectado ninguna enfermedad como consecuencia de un deficiente aporte de nucleótidos; sin embargo, la imposibilidad de usar la via de recuperación y, consecuentemente, no poder reutilizar nucleótidos, origina las características alteraciones neurológicas del síndrome de Lesch-Nyhan.

Existe evidencia de que ciertos tejidos poseen una limitada capacidad para la síntesis de nucleótidos de purina (Savaiano y Clifford, 1981; LeLeiko et al., 1979; Roux, 1973). Médula ósea y mucosa intestinal y en general, tejidos en rápido crecimiento, parecen ser dependientes del aporte exógeno de nucleótidos para su funcionamiento óptimo. Para algunos autores, los nucleótidos pueden considerarse como nutrientes semiesenciales (Uauy, 1989). Así, cuando la dieta es deficiente se activa su síntesis *"de novo"* (Leleiko et al., 1979, 1983).

La cantidad de nucleótidos en la leche humana no es nada despreciable y se ha estimado que un neonato puede ingerir entre 1.4 y 2.1 mg de nucleótidos solubles diarios (Janas y Picciano, 1982). La leche humana contiene cerca de un 6% del total de nitrógeno como nucleótidos solubles (Gil y Sánchez-Medina, 1982; Janas y Picciano, 1982) y gran cantidad de ácidos nucleicos (Sanguansermsri et al., 1974). Los ácidos nucleicos ingeridos son degradados a nivel intestinal por enzimas proteolíticas pancreáticas y los nucleótidos son transformados en nucleósidos y bases merced a la acción de fosfodiesterasas, nucleotidasas y

la de colonización bacteriana, cosa que no ocurre con las fórmulas, que aunque tengan inmunoglobulinas, estas se inactivan en la elaboración de las mismas. En este sentido, la lactancia materna es, sin duda, la mejor nutrición del neonato. Aún cuando la tendencia a alimentar al pecho a los neonatos es creciente, es muy frecuente el uso de fórmulas lácteas.

Dadas las diferencias entre las leches humana y de otras especies, las fórmulas se han ido modificando para hacerla lo más parecidas posible a la primera ("fórmulas maternizadas"). Con relación a los nucleótidos, la leche humana es significativamente diferente de la de otras leches usadas en la elaboración de las fórmulas (Janas y Picciano, 1982). La corrección de la composición nucleotídica de las fórmulas puede ser por tanto de indudable interés. Dado que la leche de vaca carece de nucleótidos como UMP, GMP, UDP, CDP, GDP y contiene menores concentraciones de AMP y ADP, se está comenzando a añadirlos. Los estudios realizados hasta el momento han demostrado que la suplementación con nucleótidos resulta beneficiosa.

Efectos de los nucleótidos

Absorción del hierro

Se ha sugerido que los nucleótidos de la leche humana, particularmente la inosina, juegan un papel facilitador de la

absorción intestinal del hierro. La evidencia para este aspecto funcional de inosina fue sugerida en primer lugar por experimentos realizados por Mazur et al. indicando que el hierro podría movilizarse desde los tejidos celulares a través de la reducción y la liberación de hierro de la ferritina por la xantina oxidasa (Mazur et al., 1958). Experimentos *in vitro* demostraron que la xantina oxidasa en la presencia de estos sustratos, o ácido úrico solamente, puede reducir el hierro de la ferritina y aumentar el hierro ferroso que podría abandonar las células intestinales y así podría entrar en las células desde el lumen y unirse a la apoferritina dentro de la célula.

A comienzos de los años 60, Cheney y Finch examinaron el efecto de la inosina en la absoción oral e intravenosa de hierro en las ratas. Un aumento en la utilización de hierro se demostró unicamente para el hierro intravenoso (Cheney y Finch, 1960). Varios años más tarde estos hallazgos fueron reexaminados en estudios *in vitro* e *in vivo*. La absorción de hierro en el intestino se ensayó en presencia y ausencia de inosina. Se halló que inosina, hipoxantina y ácido úrico aumentaban significativamente la absorción del hierro (Faelli, 1970). Los lugares de la absorción intestinal del hierro, el duodeno y yeyuno proximal, fueron capaces de metabolizar la inosina a xantina y ácido úrico. Por esta razones, McMillan et al. supusieron que los componentes nucleótidicos de la leche humana podrían ser factores que facilitaran la absorción de hierro en niños alimentados al

pecho (Sánchez-Pozo et al., 1986). Tal efecto podría explicar en parte las diferencias observadas en la absorción de hierro entre niños alimentados al pecho y los alimentados con fórmulas adaptadas, a pesar de los más bajos niveles de leche materna. Se necesitan estudios clínicos para evaluar otros nucleótidos y sus metabolitos que aún no han sido estudiados con respecto a los efectos sobre la absoción de hierro.

Flora intestinal

Se conoce desde hace tiempo en pediatría que la microflora intestinal de los niños alimentados al pecho es diferente de la flora de los niños alimentados con fórmulas basadas en leche de vaca. De las bacterias aerobias, las bifidobacterias predominan en el intestino de los niños alimentados al pecho mientras que las bacterias gram negativas son los organismos dominantes en los niños alimentados con fórmulas de leche de vaca. El porcentaje y distribución de las bifidobacterias varia con la edad postnatal y la dieta.

La abundancia de bifidobacterias en la microflora intestinal de niños alimentados al pecho puede relacionarse con ciertos efectos favorables. Las bifidobacterias contribuyen a bajar el pH del contenido intestinal debido a su actividad hidrolítica sobre varios azúcares. Esto puede servir de impedimento a la proliferación y/o crecimiento de microorganismos ácido

intolerantes tales como *Bacteroides* y *Clostridum*. Otros autores han sugerido que las bifidobacterias pueden ser capaces de sintetizar factores antimicrobianos específicos los cuales tienen un efecto protector frente a varias enterobacteriaceas u otras bacterias asociadas con gastroenteritis aguda en los niños, tales como Escherichia Coli (Gil et al., 1986). Gyorgy et al. aislaron una cepa de *Bacillus bifidum Pennsylvanicus* que se pensó era necesaria en la leche humana para el crecimiento (Gyorgy et al., 1954). Estudios sobre las necesidades nutricionales de bifidobacterias nos dan algunas evidencias para la asociación entre nucleótidos de la dieta y microflora intestinal.

Nuestro grupo de investigación ha estudiado los efectos de nucleótidos añadidos sobre el crecimiento *in vitro* de las bifidobacterias. La adición por separado de AMP, CMP, GMP, UMP o IMP a un medio de cultivo mínimo se encontró que estimulaba ligera pero significativamente el crecimiento *in vitro*. La adición simultánea de todos los nucleótidos mencionasdos más arriba estimuló el crecimiento en mayor medida (Gil, 1984). Se llevaron a cabo estudios clínicos para determinar los efectos de las fórmulas suplementadas con nucleótidos sobre la microflora intestinal. La microflora fecal de niños alimentados con fórmulas de leche de vaca con o sin nucleótidos se examinó y comparó con la microflora fecal de bebés alimentados al pecho. El recuento bacteriano se expresó como porcentaje del total de bacterias. En los niños alimentados al pecho encontramos mayores porcentajes de

bifidobacterias fecales y porcentajes menores de lactobacilos y enterobacteriaceas que en niños alimentados con fórmulas. El grupo suplementado con nucleótidos presentó valores intermedios, pero más cercanos a los alimentados con leche humana. Los nucleótidos pueden ejercer un efecto inhibidor sobre las sustancias presentes en el lumen intestinal. Por ejemplo, facilitando la absorción de hierro, los nucleótidos IMP pueden disminuir la disponibilidad de este metal para el crecimiento de enterobacterias. Además, los nucleótidos *in vivo* son potencialmente factores de crecimiento *per se* para varias especies de bifidobacterias o pueden actuar promocionando la liberación de otros factores de crecimiento dentro del lumen intestinal.

Metabolismo de los lípidos

Nuestro grupo de investigación ha estudiado los cambios en las lipoproteínas del suero en niños alimentados con fórmulas diferentes únicamente en el contenido de nucleótidos (Sánchez-Pozo et al., 1986). Los cambios en las lipoproteínas del suero en estos niños se compararon con los de niños alimentados al pecho durante el primer mes de vida. El colesterol en HDL fue mayor a la semana de vida en los niños que recibieron nucleótidos. Al mes de vida, dicho colesterol permaneció más elevado en los niños alimentados al pecho o con nucleótidos que en los que no los recibieron. El colesterol en VLDL aumentó en todos los niños durante el primer mes de vida. Sin embargo, al mes, los niños alimentados al pecho

y los que recibieron nucleótidos en la fórmula tuvieron menores niveles de colesterol de VLDL que aquellos alimentados con una fórmula sin nucleótidos.

Estos hallazgos sugieren que los nucleótidos pueden jugar un papel en la síntesis hepática o intestinal de lipoproteínas. Los mecanismos de estos cambios son desconocidos pero estos estudios sugieren que los nucleótidos pueden estimular la síntesis de las HDL. Por el contrario, los nucleótidos podrían interferir con la formación de VLDL. Esto puede ser similar a la acción del ácido orótico el cual induce hígado graso por bloqueo de la secrección de VLDL (Von Euler et al., 1963 y Durschlar y Robinson, 1980).

En un estudio reciente en ratas lactantes (Garcia-Molina et al., 1991), hemos encontrado que la administración de nucleótidos desde el nacimiento hasta el destete origina un incremento en los niveles de HDL y apolipoproteína AI. Los niveles de Apo B y fosfolípidos también se encontraron elevados. Sin embargo, los niveles de Apo E se encontraron disminuídos. Estos resultados sugieren que los nucleótidos de la dieta pueden aumentar la síntesis intestinal de lipoproteínas.

Se sabe que la grasa de la dieta influencia cualitativamente los ácidos grasos séricos en los neonatos (Putnam et al., 1982; Uauy y Gil, 1985). Además, la dieta ejerce cambios relacionados

especialmente con los ácidos grasos poliinsaturados en las fracciones fosfolipídicas de membrana. Se han estudiado los efectos de los nucleótidos de la dieta sobre los ácidos grasos componentes del suero y de las membranas de eritrocitos (Uauy y Gil, 1985; Gil et al., 1988). Durante el primer mes de vida, los niños se alimentaron con fórmulas con o sin adición de nucleótidos. La adición de nucleótidos era la única diferencia entre estas fórmulas. Otro grupo se alimentó al pecho y la composición de ácidos grasos se estudió periodicamente. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en plasma con más de 18 carbonos de la serie omega-6 en lípidos totales y en fracciones específicas, concretamente fosfolípidos, estaban significativamente incrementados en los niños alimentados al pecho y en los alimentados con fórmulas con nucleótidos comparados con los niños alimentados con fórmulas carentes de ellos. El incremento en la concentración de los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena en niños alimentados con fórmulas con nucleótidos y el no incremento en niños alimentados con fórmulas convencionales sugiere que la dieta con nucleótidos puede influenciar la síntesis hepática o intestinal de estos ácidos grasos, posiblemente influenciando la actividad de las enzimas desaturasas. La maduración de la enzima δ-6 desaturasa tiene lugar después del nacimiento. Además, se sabe que la δ-5 desaturasa aparece disminuída al comienzo de la vida. El porcentaje más bajo de ácido araquidónico con relación a linoléico en el suero de los niños alimentados con fórmulas comparado con los alimentados al

pecho y niños alimentados con fórmulas suplementadas con nucleótidos indican que estas dietas con nucleótidos influyen en la desaturación y elongación (Gil, et al., 1986; Pita, et al., 1988).

Usando los grupos antes descritos, también hemos demostrado en niños nacidos a término y pretérmino que los nucleótidos de la dieta afectan a la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana eritrocitaria (DeLucchi, et al., 1987; Pita et al., 1988). La concentración de ácido linoléico se incrementó en casi todos los fosfolípidos de la membrana en niños alimentados con fórmulas lácteas. Las concentraciones de ácido araquidónico y ácido docosatetraenóico (20: 4w6 y 22: 4w6) de la fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC) se incrementaron significativamente en neonatos alimentados con leche materna y fórmulas con nucleótidos comparados con aquellos alimentados con fórmulas sin nucleótidos. Resultados similares se observaron en los ácidos grasos de la membrana de las series w6 y w3 con 18 o más carbonos.

La actividad de desaturación de varias enzimas en la vía se estimuló comparando la suma de los productos de la reacción con la de los precursores. Usando este método, las actividades de δ-6, δ-5 y δ-4 desaturasas se encontraron incrementadas en el grupo que recibió nucleótidos comparados con el grupo sin nucleótidos. Las actividades enzimáticas fueron similares en los alimentados al

pecho y los grupos con nucleótidos. Estos hallazgos sugieren que los nucleótidos de la dieta pueden jugar un papel estimulador o inductor de las desaturasas hepáticas o intestinales que de otra forma son inmaduras en el neonato. Las actividades de las vías enzimáticas para la desaturación y la elongación de los ácidos grasos de la dieta necesaria para la producción de ácidos grasos de cadena larga son muy importantes en el desarrollo cerebral dado que estos PUFA son componentes estructurales del sistema nervioso. La leche materna, en contraposición a las fórmulas comerciales, proporciona suficientes ácidos grasos PUFA de cadena larga, de las series omega-3 y omega-6.

Tolerancia de las fórmulas y crecimiento de los tejidos

Los primeros datos sobre este aspecto descritos por autores japoneses indican una mejora en el sabor de las fórmulas infantiles por la adición de nucleótidos. Kobata et al. demostraron que los niños que no querían beber leche de vaca se la bebían cuando se añadían nucleótidos (Kobata, 1960). Todavía más, estos investigadores sugirieron que la digestibilidad de la lecha de vaca se mejora por la adición de nucleótidos, que pueden actuar reduciendo la dureza de la cuajada. Sin embargo, en siguientes experimentos realizados por otro grupo japonés la ingesta y tolerancia de la fórmula fue similar en grupos de niños que recibieran o no pastillas de nucleótidos con la fórmula basada en leche de vaca (Nayai et al., 1963). El aumento de peso fue

ligeramente superior en el grupo de los alimentados con nucleótidos, aunque la diferencia no es importante. La suplementación con nucleótidos no afectó la aparicicón o frecuencia de los movivmientos intestinales ni modificó las proteínas totales del suero, las fracciones de proteínas del suero, la hemoglobina, los eritrocitos, ni la cantidad de leucocitos en sangre. Otros autores han demostrado que la adición de nucleótidos a una dieta baja en proteínas en ratas recién destetadas mejora significativamente la ganancia de peso.

Un examen cuidadoso del efecto de los nucleótidos sobre la ganancia de peso, crecimiento, perímetro craneal y otros índices antropométricos en recién nacidos a término y pretérmino, no mostró efectos detectables. Así, muy probablemente, la síntesis de nucleótidos de *novo* bajo condiciones de una gestación completa y una dieta completa es suficiente para el crecimiento normal.

Nuestro grupo ha examinado recientemente el efecto de los nucleótidos de la dieta sobre la reparación intestinal usando dos modelos independientes con ratas recién destetadas. En el primer modelo usamos ratas malnutridas con diarrea crónica producida por la ingestión de lactosa. El contenido en DNA y la actividad de lactasa, maltasa y sacarasa se recuperaron más rapidamente en el grupo de animales alimentados con una dieta suplementada con nucleótidos que los alimentados con una dieta sin nucleótidos tras la diarrea. La microscopía electrónica de trasmisión reveló que

las mitocondrias hinchadas en los animales con diarrea se normalizaron en el grupo que recibió nucleótidos pero no en el grupo que tomó la dieta sin nucleótidos (Nuñez et al., 1988). El segundo modelo usó ratas recién destetadas con poca secrección intestinal. Los resultados obtenidos sugieren que una dieta sin nucleótidos induce un descenso en el contenido proteico del intestino delgado proximal el cual se asocia con una actividad maltasa menor (Uauy y String, 1988). El intestino distal no se afectó, en concordancia con los datos de LeLeiko que indican una muy baja síntesis *de novo* en el intestino proximal cuando se comparó con el cólon y el hígado.

Ogoshi et al., recientemente ha descrito que los nucleótidos y nucleósidos administrados en nutrición parenteral, son los responsables del incremento en la actividad mitogénica de los hepatocitos durante la regeneración experimental de ratas hepatectomizadas.

Recientemente se ha sugerido que las purinas en el hígado pueden ser responsables del incremento en la actividad mitogénica de las células hepáticas. La diadenosina tetrafosfato es la responsable y parece tener un efecto directo sobre la síntesis de DNA así como en la activación de los aminoacil-tRNA (Yamaguchi et al., 1985). Este y otros estudios en células en rápida división sugiere que las purina exógenas pueden aumentar la proliferación de células y recuperación optima después de una lesión.

Todavía no se conoce si los nucleótidos pueden optimizar el desarrollo intestinal de los niños o influenciar la reparación intestinal de niños con síndromes de malabsorción.

Función inmune

La posibilidad de que los nucleótidos exógenos modularan la función inmune se sospechó por el efecto de una dieta sin nucleótidos en las células-T (Van Buren et al., 1983; Kulkarni et al., 1982). Estudios posteriores han demostrado que la alimentación de ratones con dietas sin nucleótidos perjudica la maduración funcional de las células-T (Kulkarni et al., 1984). Los niveles más altos de la actividad desoxinucleotidil transferasa en ratones alimentados con dietas sin nucleótidos sugiere un desarrollo alterado de las células-T (Rudolph et al., 1984 y 1985). La carencia de los nucleótidos también incrementa la mortalidad de ratones en los que se indujo septicemia por la inyección intravenosa de *Staphilococus aureus* (Kulkarni et al., 1986). Los desórdenes metabólicos del metabolismo de las purinas tales como la deficiencia de adenosina desaminasa y de nucleósido fosforilasa están asociados con inmunodeficiencias severas lo que supone nueva evidencia del papel potencial de los nucleótidos exógenos como moduladores de la función inmunológica (Giblett et al., 1972 y 1975; Carson et al., 1977).

Recientemente, en pacientes con trasplantes homólogos de riñón se ha visto que la alimentación parenteral con soluciones carentes de nucleótidos frecuentemente se acompaña con una disminución de rechazos. Se observó una función inmune menor a pesar de la reducción en inmunosupresores. Cuando se realimentó con una dieta conteniendo nucleótidos los rechazos aumentaron (Van Buren et al., 1985; Frederick et al., 1985).

Los efectos de los nucleótidos de la dieta se examinaron en ratones recién nacidos con trasplante homólogo cardíaco. Antes del trasplante los ratones BALB/C se mantuvieron con una dieta estándar, una dieta sin nucleótidos o una dieta con el 25% de RNA de levadura como fuente de nucleótidos. La supervivencia al trasplante era significativamente más alta en el grupo sin nucleótidos comparado con los otros grupos.

Usando los mismos grupos, estos investigadores examinaron la respuesta linfoproliferativa aguda a aloantígenos. Los animales que recibieron dietas libres de nucleótidos tenían una respuesta proliferativa menor. De forma similar la hipersensibilidad cutánea tardía frente a derivado purificados de proteínas o eritrocitos de carnero estaba disminuída en el grupo de dieta sin nucleótidos comparado con los demás.

En otro experimento se examinaron los efectos de una dieta sin nucleótidos sobre la respuesta inmunológica de ratones

singénicos. La respuesta proliferativa *in vitro* de células del bazo a fitohemaglutinina estaba significativamente reducida en el grupo sin nucleótidos. Esos experimentos sugirieron que el linfocito T es muy sensible a la carencia de los nucleótidos de la dieta. Para determinar el mecanismo responsable de este fenómeno, se estudiaron las características fenotípicas de subpoblaciones de linfocitos manteniendos con una dieta sin nucleótidos y se compararon con otros alimentados con dieta normal o dietas adicionadas de RNA, adenina o uracilo. La restricción de los nucleótidos afectó a los fenotipos de linfocitos T y a la función de las células T. La producción de interleukina-2 (IL-2), una linfokina vital para la proliferación de linfocitos T, se eliminó en linfocitos de bazo irradiadostras estimulación con concanavalina-A en el grupo carente de nucleótidos. Estos datos sugieren que los linfocitos T colaboradores necesitan nucleótidos exógenos. Las mismas dietas se usaron para determinar la influencia de la retirada de los nucleótidos sobre la resistencia a la infección en ratones. La restricción de nucleótidos aumentó la mortalidad frente a una sepsis por estafilococos y afectó de modo adverso a la resistencia frente a *Candida albicans*. La adición de uracilo a las dietas sin nucleótidos en cualquioera de los experimentos anteriores originó una resistencia similar a la observada cunado usaron la dieta normal o suplementada con RNA. Esto indica que el uracilo proteje contra la infección. La función fagocítica también fue determinada en ratones frente a *Staphylococcus aureus*. Los macrófagos procedentes de los ratones

con la dieta sin nucleótidos mostraron una menor actividad tal como se desprende de la medida de captación de bacterias marcadas radioactivamente. La relación de los nucleótidos y la inmunidad se ha estudiado por Barness y Carver. La adicción a nucleótidos en ratones aumentó la fagocitosis de los macrófagos así como la actividad de las células "killer" (Barness y Carver, 1985).

En un estudio reciente de nuestro grupo se ha encontrado que los linfocitos de sangre de cordón umbilical en presencia de nucleótidos incrementaron su capacidad linfoproliferativa *in vitro* en respuesta a mitógenos. Esto indica claramente que en el neonato los nucleótidos pueden tener importancia en el mantenimiento de la respuesta inmune.

II.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El primer objetivo fue ampliar el conocimiento de los cambios que tienen lugar en el metabolismo de las lipoproteínas en el período inmediatamente postnatal en niños de bajo peso en vista de los escasos datos existentes. Además, la información de que se dispone resulta confusa ya que bajo la denominación de neonatos de bajo peso se incluyen tanto prematuros como nacidos a término pequeños para la edad gestacional.

Otro objetivo fundamental de este trabajo era evaluar la repercusión de los nucleótidos de la dieta sobre el metabolismo lipídico en la etapa inmediatamente posterior al nacimiento. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación habían puesto de manifiesto cambios significativos en los valores de colesterol de neonatos alimentados con fórmulas conteniendo nucleótidos frente a la lactancia materna (Sánchez-Pozo et al., 1986). En estos trabajos no se llevó a cabo aislamiento y caracterización de las lipoproteínas por lo que la validez de los resultados era limitada. Asimismo, los efectos se compararon a los valores encontrados en niños alimentados con leche materna. Este control es menos adecuado que el que podría usarse cuando la alimentación es con la misma fórmula carente de nucleótidos.

De acuerdo con los objetivos anteriormente señalados, en primer lugar, se puso a punto la metodología analítica que

permitió la separación de las lipoproteínas por ultracentrifugación en volúmenes de muestra reducidos. (400 µL.) Asimismo, se pusieron a punto las técnicas analíticas para la caracterización y cuantificación de las apolipoproteínas, microscopía electrónica, etc.

En segundo lugar, se elaboraron las fórmulas lácteas para los distintos grupos de niños, unas carentes de nucleótidos y otros conteniendo nucleótidos de acuerdo a las recomendaciones de la ESPGAN. Finalmente, tras una meticulosa selección, se establecieron tres grupos de neonatos: nacidos a término adecuados para la edad gestacional (normales), nacidos pretérmino de peso adecuado para su edad gestacional (prematuros) y nacidos a término de peso pequeño para su edad gestacional (CIR). A todos se les alimentó exclusivamente con fórmulas y se analizaron las lipoproteínas a diferentes edades así como el colesterol total plasmático.

El estudio de las lipoproteínas ha consistido en su aislamiento; determinación de los componentes lipídicos fundamentales: colesterol libre, colesterol esterificado, triacilglicéridos y fosfolípidos; determinación de la composición en apolipoproteínas y cuantificación de apolipoproteína A-I y B, así como estudio al microscopio electrónico. Igualmente se han determinado diversos cocientes relativos a la composición que permiten un mejor conocimiento de las partículas, entre ellos el

cociente colesterol esterificado/colesterol libre como índice de la actividad LCAT.

III.- MATERIAL Y METODOS

III.1.- Sujetos. El presente estudio se ha llevado a cabo en recién nacidos del Hospital Materno-Infantil de Granada, con el consentimiento de los padres y la aprobación de la Comisión de Investigación del Hospital.

Tres grupos de recién nacidos han sido incluidos en este estudio (tabla nº2). Los niños que presentaron alguna patología fueron eliminados. Finalmente, los datos de 11 neonatos nacidos a término adecuados para la edad gestacional (normales), 21 prematuros de peso adecuado y 19 nacidos a término pequeños para la edad gestacional (CIR) han sido evaluados. Además se estudió un grupo compuesto por 6 adultos sanos.

Todas las madres tuvieron un embarazo y parto normal. El test de Apgar fue óptimo. La valoración de la edad gestacional se estableció de acuerdo con la fecha de la última regla y el método Farr-Dubowitz.

Tabla nº2. - Pesos y edades gestacionales de los grupos de estudio. Los datos se presentan como media ± DS. El número de casos se indica entre paréntesis.

	Peso (gramos)	Semanas gestación
Normales (n=11)	3279 ± 385	39.2 ± 1.0
Prematuros (n=21)	2139 ± 230	34.4 ± 0.7
CIR (n=19)	2140 ± 168	39.2 ± 1.3

III.2.- Dietas. Los neonatos fueron alimentados exclusivamente con fórmulas lácteas de similar valor energético y formuladas de acuerdo con las recomendaciones de la ESPGAN (tabla nº3). La fórmula 1 se usó para normales y la 2 para neonatos de bajo peso.

En cada grupo de neonatos se realizaron al azar dos subgrupos: un subgrupo fue alimentado con la fórmula convencional y el otro subgrupo con la misma fórmula suplementada con nucleótidos.

Tabla nº3. - Composición de las fórmulas usadas en el estudio. Los valores se refieren a 100 g de polvo.

Nutrientes	Fórmula 1	Fórmula 2
Proteínas (g)	12.2	15.0
Lípidos (g)	29	28
Grasa láctea	15.6	7
Grasa vegetal	13.4	16
MCT	2.34	5
H. de carbono (g)	53.5	51.4
dextrinomaltosa	----	27.9
lactosa	53.5	23.5
Sales minerales (g)	2.4	3.3
Vitaminas	(Según recomendaciones de ESPGAN)	
Nucleótidos (mg)		
(Solo en fórmulas suplementadas)		
UMP 3.42		
GMP 1.49		
AMP 1.32		
CMP 1.12		
IMP 0.45		
Valor energético	530 kcal	521 kcal

III.3.- Muestras. Las determinaciones analíticas se realizaron en: sangre del cordón umbilical y sangre periférica los dias 3 y 7 de vida. También se analizaron, en algunos casos, muestras obtenidas a las 3 horas de vida y a los 28 dias de edad.

La sangre de cordón se obtuvo inmediatamente tras el parto y pinzamiento del cordón umbilical. La sangre periférica se obtuvo por punción venosa inmediatamente antes de la toma del alimento (ayuno de 6 horas). Las muestras de adultos se obtuvieron también en ayunas a primera hora de la mañana.

La sangre se recogió sobre una solución de EDTA (1 mg/ml) a pH 7. El plasma se obtuvo inmediatamente por centrifugación en frío y se guardó a -20°C hasta su análisis.

III.4.- Métodos de laboratorio.

III.4.1.- Ultracentrifugación de lipoproteínas: El aislamiento de las fracciones lipoproteicas plasmáticas se realizó a partir de 400 µl. de plasma, por ultracentrifugación diferencial en soluciones de cloruro de cesio (ClCs) de densidades crecientes, de acuerdo al método descrito por Kupke (Kupke y Wörz-Zeugner, 1986), cuyo esquema se muestra en la figura nº 3. Todas las manipulaciones tanto de muestras como de reactivos se realizaron

a 4°C. El ClCs usado fue de calidad "Suprapur" de la firma Merck. Las centrifugaciones se realizaron en una ultracentrífuga Beckman TL-100 a 4 °C. Las fracciones aisladas se recogieron con jeringas Hamilton y se conservaron a -20°C en tubos Eppendorf.

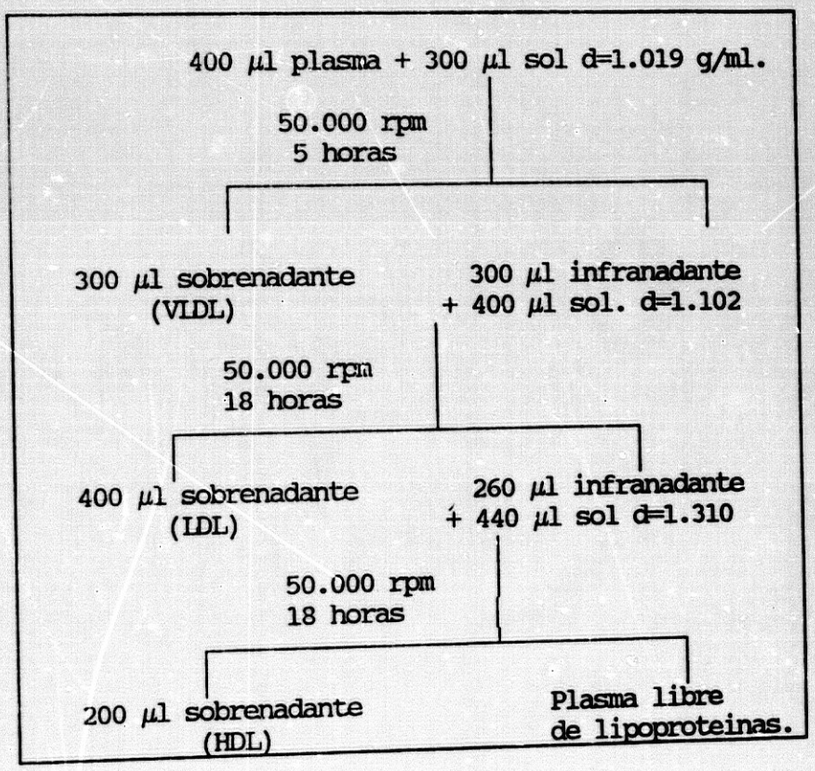

Figura nº 3.- Esquema del procedimiento seguido para el aislamiento de las lipoproteínas con indicación de las fracciones aisladas.

El método mostró una recuperación media del 87.6 ± 2.1 %, calculada como colesterol recuperado en las distintas fracciones frente al total plasmático. Las fracciones aisladas fueron

sometidas a electroforésis en gel de poliacrilamida Lipophor a fin de comprobar la existencia de una sola banda como criterio de pureza del aislamiento. La técnica se detalla a continuación.

III.4.2.- Estudio electroforético de lipoproteínas aisladas: Las fracciones aisladas se analizaron mediante electroforésis vertical en geles de poliacrilamida (3%), de acuerdo con la técnica de Lipohor (Ames, Miles Martin lab.) basada en el método descrito por Cornwell (Cornwell y Kruger, 1961). 25 µl. de muestra se mezclaron con 0.2 ml. de una solución compuesta por: acrilamida 3 g/dl; N,N' metilen-bis-acrilamida 0.25 g/dl; sudán black B 4.5 mg/dl; catalizador; conservante y tampón. Tras fotopolimerización durante 30 minutos, se sometieron a una corriente constante de 5 mA por tubo, hasta que el indicador del frente (azul de bromofenol) se situó a 4-5 mm del final del tubo. El tampón de electroforésis contenía: Tris 27% (v/v); ácido bórico 73% (v/v); pH = 7.4-7.9. Las fraccciones aisladas de lipoproteínas que contenían una contaminación superior de 5% fueron descartadas del estudio.

III.4.3.- Caracterización de apolipoproteínas: La composición en apolipoproteínas de las fracciones aisladas por ultracentrifugación se determinó mediante electroforésis en geles de poliacrilamida conteniendo Lauril Sulfato Sódico (LSNa) y Glicerol (Maguire et al., 1989). 15 µg de VLDL y 10 µg de LDL o HDL fueron desnaturalizados en 2 volúmenes de tampón de muestra

(40 ml H2O, 1.52 g Tris, 20 ml Glicerol, 2 g LSNa, 2 ml ß-ME, 1 mg azul de bromofenol, pH = 6.8) a ebullición durante 5 min. La electroforésis se realizó en una cubeta Pharmacia GE-2/4 LS refrigerada, en geles de 3 mm de espesor. El gel estaba compuesto por un 7% de acrilamida (con una relación acrilamida/bisacrilamida de 20:1), un 18% (v/v) de glicerol, un 0.1% (p/v) de LSNa, 0.075% (v/v) de TEMED; 0.01% (p/v) de persulfato amónico y tampón Tris-Fosfato 0.1 M de pH = 6.8. El tampón usado en la electroforésis fue: para la cámara inferior de la cubeta, Fosfato sódico 0.1 M (pH = 7) y para la cámara superior Fosfato sódico 0.1 M y LSNa 0.1% (pH = 7).

La electroforésis se efectuó con una corriente constante de 20 mA durante 30 min. y a continuación a 60 mA durante 4.5 horas. Terminada la electroforésis, los geles se fijaron en una solución de formaldehido al 4% durante 30 min. y a continuación se tiñeron en una solución de Coomasie Brilliant Blue G-250 (0.025% en metanol al 45.5% y ácido acético al 9.2%) durante toda la noche. La decoloración se efectuó en una solución de ácido acético al 7.5% y metanol al 5%. Los geles se conservaron en acético al 5% hasta su análisis.

Para la identificación de las bandas se usaron apoproteínas estandar (Sigma. Co, USA), así como un marcador de pesos moleculares compuesto por: fosfosilasa b, albúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y x-lactalbúmina.

III.4.4.- Determinación cuantitativa de apolipoproteínas: Se han cuantificado las apolipoproteínas A1 y B mediante la técnica de electroinmunodifusión en geles de agarosa conteniendo anticuerpos monoespecíficos: Kit Hydragel Apo A1B de la firma Sebia (Francia).

La determinación se mostró lineal en el rango de concentraciones entre 0.50 y 2.02 g/l, con un coeficiente de variación global del 6 ± 3 %.

III.4.5.- Determinación de colesterol: La determinación de colesterol se llevó a cabo usando kits comerciales de la firma Biotrol (Francia). El método se fundamenta en la técnica colorimétrica-enzimática de Trinder (Trinder, 1969). 10 µl. de plasma se incubaron durante 5 min. a 37°C con la mezcla reactiva. La quinonimina que resulta como producto final de la reacción se determinó en un espectrofotómetro Bekman DU-70 a 500 nm. La absorbancia se determinó frente a un blanco de reactivos. Como controles se usaron sueros calibrados Precilip de la firma Boëhringer Mannheim. La técnica seguida fue lineal en el margen de concentración de 0-1000 mg/dl, obteniéndose un coeficiente de variación CV = 3.6%.

La determinación de colesterol no esterificado se realizó por el mismo procedimiento antes descrito, salvo que la mezcla reactiva no contenía colesterol-esterasa. La concentración de

colesterol esterificado se calculó por diferencia entre colesterol total y no esterificado.

III.4.6.- Determinación de triglicéridos: La determinación de triglicéridos se llevó a cabo saponificando con lipasa y determinando el glicerol resultante con la combinación enzimática glicerol cinasa-glicerol 3-fosfato oxidasa-peroxidasa. Se usaron kits comerciales de la firma Biotrol (Francia). El método fue lineal en el rango de concentraciones usadc, siendo el coeficiente de variación CV= 6.4 %.

III.4.7.- Determinación de fosfolípidos: Los fosfolípidos se determinaron por su contenido en colina de acuerdo con el método de Takayama et al. (1977) usando un kit comercial de la forma Boehringer Mannheim. El ensayo es lineal en el margen de concentraciones estudiadas, mostrando un coeficiente de variación del 5%.

III.4.8.- Microscopía electrónica: Las fracciones lipoproteicas aisladas se mezclaron con ácido fosfotúngstico al 2% (pH 7.4) y tras eliminar el exceso de líquido se secaron y se examinaron en el microscopio electrónico Zeiss EM-902 a 80 Kvoltios.

III.4.9.- Determinación de proteínas: La determinación de proteínas del plasma se realizó por el método de Lowry (Lowry et

al., 1951). La determinación de proteínas en fracciones lipoprotéicas por el de Bradford (Bradford, 1976), que evita las interferencias de las sales de cesio. En ambos casos se usó albúmina bovina, calidad Merck (0.5 mg/ml) como estándar.

III.4.9.1.- En la técnica de Lowry 1 ml. de muestra se mezcló con 5 ml. de reactivo del biuret (100 ml de solución de CO_3Na_2 al 2% en NaOH 0.1N y 2 ml de solución de $SO_4Cu.5H_2O$ al 0.5% en tartrato sódico al 1%). Tras 15 min. de incubación, se añadió el reactivo diluido de Folin (1:1) y tras 20 min. se determinó la absorción a 640 nm. Este método presentó una perfecta linealidad de la concentración protéica frente a la D.O. medida coeficiente de variación del método fue del 11%.

III.4.9.2.- En la técnica de Bradford: 100 µl. de muestra de muestra diluida (aprox. 1 mg/ml) se hacen reaccionar con 1 ml. de solución reactiva (100 mg Azul Coomasie G-250 en 50 ml. de etanol 95% y 100 ml. fosfórico 85% y c.s. de agua para 1 l.) durante 2 minutos a temperatura ambiente, determinándose la absorbancia a 595 nm. El método mostró una correlación lienal en el margen de concentraciones 0-0.1 mg/ml. El coeficiente de variación del método fue del 16%.

III.4.10.- Separación de proteínas plasmáticas: Se ha realizado por electroforésis en acetato de celulosa (Cellogel, Atom, España). 5 µl. de plasma se sometieron a electroforésis en

tampón barbital pH 8.6, durante 35 minutos a una corriente constante de 200 voltios. Las bandas fueron teñidas con rojo ponceau S y decoloradas en ácido acético al 7%. Los porcentajes relativos de las distintas fracciones proteicas se determinaron densitometricamente.

III.4.11.- Determinación de urea: La concentración de urea plasmática se determinó enzimáticamente usando un Kit comercial (SeraPak, AMES), basado en el método de Fawcet (Fawcet y Scott, 1960). 20 µl. de muestra se incubaron a 37°C durante 10 minutos con 0.2 ml. de solución reactiva (ureasa 1 g/l, EDTA 116 mmol/l, Nitroprusiato sódico 6 mmol/l). A continuación se añaden 5 ml de fenol (120 mmol/l) y 5 ml de una solución de Hipoclorito sódico (27 mM) en NaOH (0.14N). Se incubó durante 15 min. a 37°C y determinándose la Absorbancia a 546 nm. La reacción fue lineal hasta concentraciones de urea inferiores a 200 mg/dl y el coeficiente de variación del método fue del 10%.

III.4.12.- Determinación de ácido úrico: La determinación de ácido úrico se realizó mediante un kit comercial de la firma Cromatest (Barcelona) basado en la reducción del ácido fosfotúngstico en medio alcalino (Henry y Sobel, 1957). El ensayo es lineal hasta concentraciones de 15 mg/100 ml, mostrando un CV del 8%.

III.4.13.- Determinación de glucosa en sangre: Se llevó a cabo usando kits comerciales Cromatest (España) según la técnica de Trinder (Trinder, 1969). La glucosa se determina con glucosa oxidasa, peroxidasa y ampirona como cromógeno. El método fue lineal en el margen de concentraciones estudiadas, siendo el coeficiente de variación del 8%.

III.5.- Análisis estadístico. Se calcularon las medias y las desviaciones estándar para cada grupo. En el caso de porcentajes, se usó la transformación arc sen $\sqrt{p}$. Los análisis estadísticos para los distintos grupos a lo largo del tiempo se realizaron mediante el análisis múltiple de la varianza (ANOVA) y los test a posteriori de Tukey y Student-Newman-Keuls usando el paquete estadístico BMDP (UCLA, Los Angeles, USA). La hipótesis nula se rechazó cuando $p < 0.05$.

IV.- RESULTADOS

IV.1.- Cambios en los niveles totales de colesterol y lipoproteínas.

IV.1.1.- Colesterol plasmático: Los niveles de colesterol plasmático en el neonato son sensiblemente inferiores a los de los adultos (tabla nº 4). Los neonatos prematuros mostraron cifras ligeramente superiores a los normales en el momento del nacimiento, mientras que los CIR no. Tras el nacimiento, los niveles se elevaron en todos lo casos. Siendo significativamente altos a partir del tercer día. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio.

IV.1.2.- Distribución del colesterol entre las fracciones lipoprotéicas: Al nacimiento, en los recién nacidos normales, la mayor parte del colesterol se encuentra en la fracción HDL. Durante la primera semana de vida se observa un aumento progresivo de LDL. Al final de la primera semana de vida la distribución es muy similar a la del adulto. En los neonatos de bajo peso no observamos cambios significativos ni en LDL ni en HDL. Además se aprecia que los niveles de colesterol-VLDL permanecen elevados con relación a los normales, especialmente en los CIR. (figura nº 4).

IV.1.3.- Concentración de lipoproteínas: La concentración de lipoproteínas ha sido estimada por numerosos investigadores bien como colesterol asociado a una fracción (ver sección IV.1.2)

o como apo proteína específica. Nuestros resultados se han calculado como la suma de todos los componentes lipídicos y protéicos. Esta forma, en nuestra opinión, refleja mejor que ninguna otra los niveles reales dada la gran heterogeneidad de partículas lipoprotéicas. Los resultados se muestran en las figuras nº 5, 6 y 7.

Los niveles de VLDL aumentaron significativamente desde el nacimiento hasta el dia 3 de vida postnatal y posteriormente descendieron. Frente a estos cambios normales, los prematuros presentan un nuevo incremento durante los primeros 3 días de vida para igualarse al séptimo. Los neonatos CIR muestran un aumento de VLDL superior a los otros dos grupos. Además, los niveles continúan elevados a la semana de vida. Las LDL apenas sufrieron cambios reseñables aunque se observó un paralelismo en la evolución con las VLDL. Por último, con relación a las HDL, hemos encontrado un aumento progresivo en neonatos normales muy significativo. En los prematuros los niveles permanecieron similares a los del nacimiento, y en los CIR se observó un aumento sólo tras el tercer día de vida. En suma, los neonatos de bajo peso alcanzaron, a lo largo de la 1ª semana de vida valores significativamente más altos de VLDL y menores de HDL que los normales.

Tabla nº4.- Niveles de colesterol plasmático en función de la edad. Los resultados se expresan en mg/dl, y son media ± SEM, indicándose el número de casos entre paréntesis. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se expresan frente a la edad anterior como a.

EDAD	NORMALES	PREMATUROS	CIR
0 (0 h)	63 ± 3 (9)	76 ± 3 (10)	63 ± 6 (9)
0 (3 h)	62 ± 7 (9)	69 ± 5 (10)	61 ± 3 (9)
3 días	95 ± 8 (7) a	103 ± 6 (9) a	109 ± 9 (10) a
7 días	105 ± 16 (4)	103 ± 7 (9)	106 ± 7 (10)
28 días	112 ± 5 (4)	116 ± 8 (6)	97 ± 9 (4)
Adultos	221 ± 15 (6) a	———	———

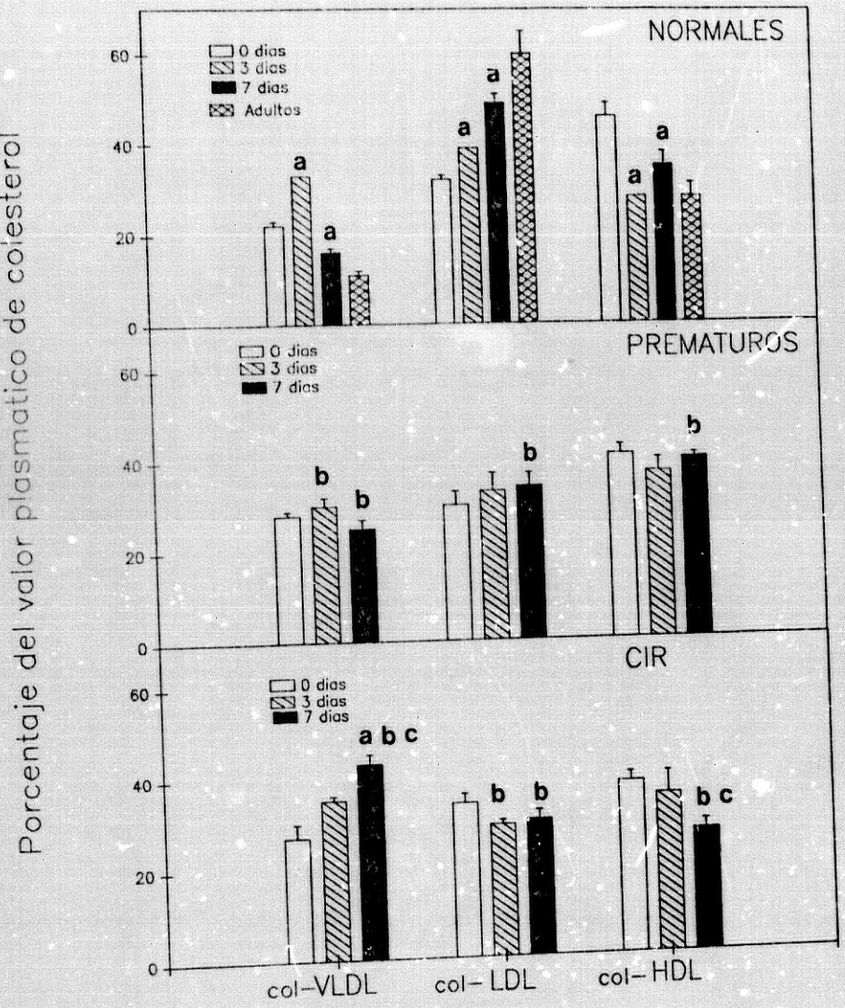

Figura nº 4.- Distribución del colesterol en las principales lipoproteínas durante la primera semana de vida. Los resultados se expresan como porcentaje del valor de colesterol total plasmático (media ± desviación estándar, n=6 casos al menos). Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; b, frente al grupo normal; c, frente al grupo de prematuros.

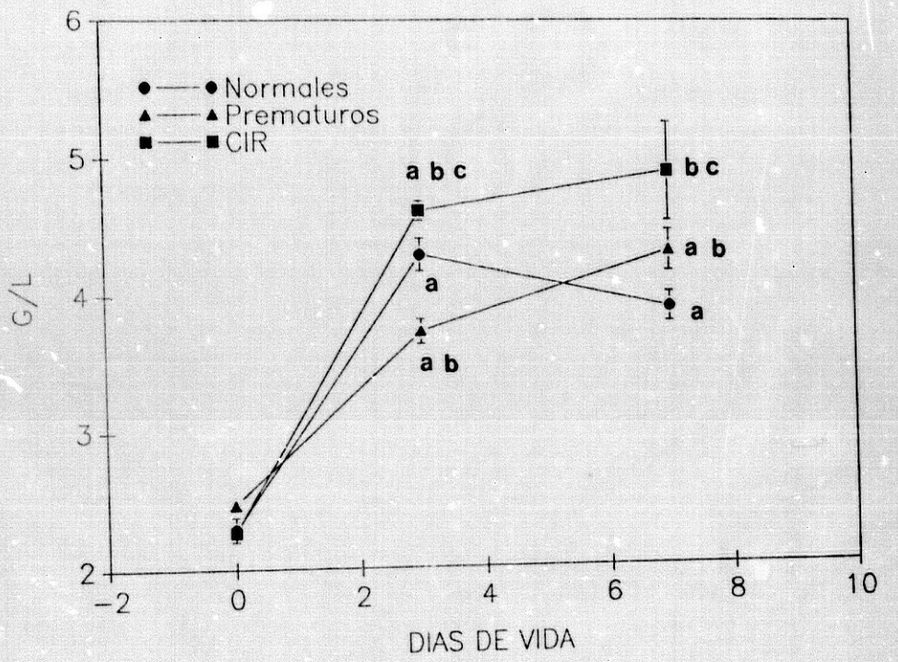

Figura nº 5.- Evolución de los niveles de VLDL en neonatos durante la primera semana de vida. Los niveles de lipoproteínas se expresan como la suma de todos los componentes lipoprotéicos. Los puntos y barras representan las medias y desviaciones estándar respectivamente. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; b, frente al grupo normal; c, frente al grupo de prematuros.

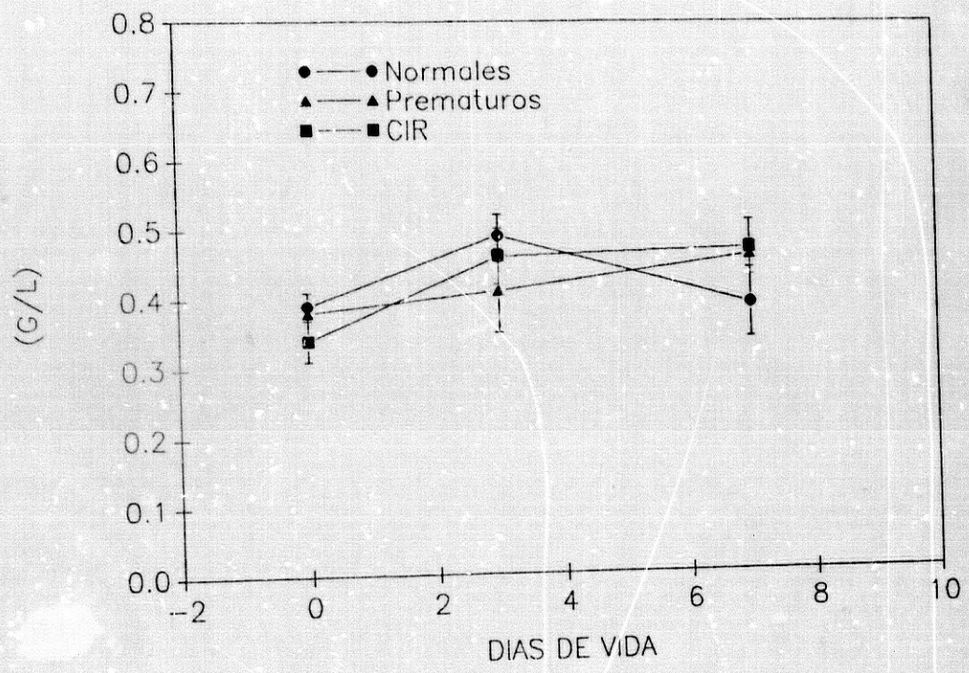

Figura nº 6.- Evolución de los niveles de IDL en neoatos durante la primera semana de vida. Los niveles de lipoproteínas se expresan como la suma de componentes. Los puntos y barras representan las medias y desviaciones estándar respectivamente.

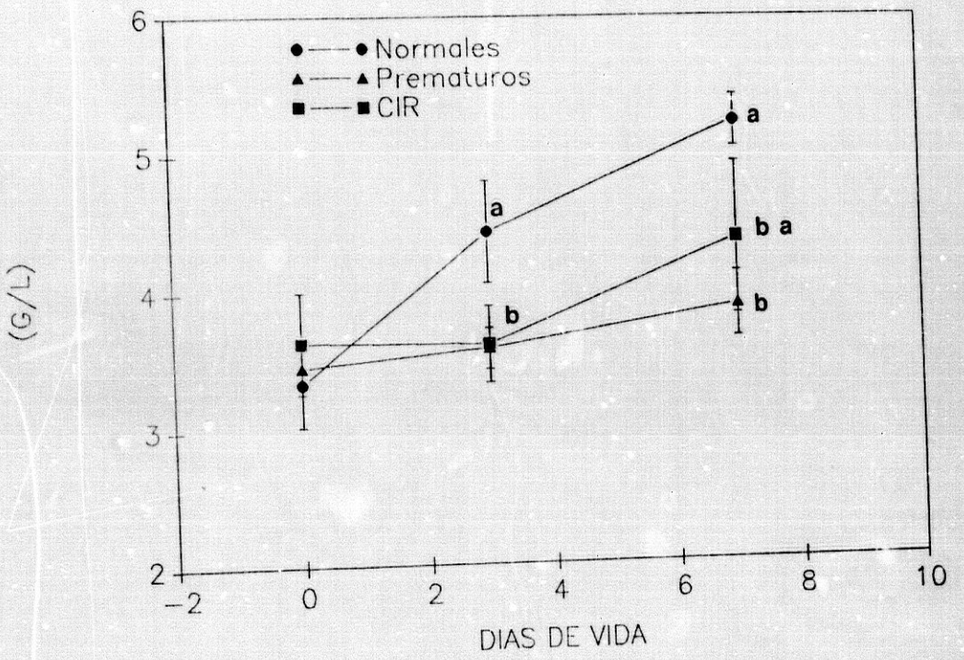

Figura nº 7.- Evolución de los niveles de HDL en neonatos durante la primera semana de vida. Los nivel de lipoproteínas se expresan como la suma de componentes. Los puntos y barras representan las medias y desviaciones estándar respectivamente. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; b, frente al grupo normal; c, frente al grupo de prematuros.

IV.2.- Cambios en la composición de las lipoproteínas

Considerando los periodos entre el nacimiento y los 3 días y entre los 3 y 7 días, la composición de las lipoproteínas muestra una elevada concentración relativa en lípidos durante el primer periodo que luego decae. No hemos encontrado diferencias entre los neonatos normales y prematuros, pero sí en el caso de los CIR se ha observado un mayor nivel de lípidos en general, más acentuado a la semana de vida y que es apreciable en todas las fracciones. (figura nº 8).

IV.2.1.- Niveles de triglicéridos: Se determinaron los contenidos en triglicéridos en todas las fracciones lipoprotéicas. El contenido en HDL fue despreciable (resultados no incluídos). En VLDL (figura nº 9), al nacimiento, los neonatos de bajo peso presentaron un menor contenido que los normales. Esta situación desaparece ya al tercer día e incluso se observa un ligero enriquecimiento por encima de los normales a la semana de vida. Estos cambios indican que los neonatos de bajo peso pobres en triglicéridos incrementan sus niveles más rápidamente que los normales. En las LDL (figura nº 10), se observó un descenso en el contenido en TG progresivo desde el nacimiento. No se apreciaron diferencias significativas entre los distintos grupos de niños, aunque el patrón de los CIR fue diferente.

IV.2.2.- Niveles de colesterol: El contenido relativo de colesterol (expresado frente a las proteínas) de las diferentes fracciones lipoprotéicas del recién nacido a lo largo de la primera semana de vida se muestra en la figura nº11. En ella se puede observar cómo al nacimiento el cociente colesterol/proteína en las lipoproteínas de los distintos grupos de neonatos es muy similar. No obstante, en los CIR, en HDL, este cociente es mayor. A los 3 y 7 días de vida los cocientes de niveles de colesterol/apoproteína aumentan. Los cambios observados no muestran consistencia aunque en general se observa un menor contenido en colesterol en los neonatos prematuros y CIR con relación a los normales. Es destacable que el nivel de colesterol en las lipoproteínas de neonatos no difiere significativamente del encontrado en los adultos.

IV.2.3.- Concentración relativa de colesterol esterificado: La determinación de la relación colesterol esterificado / colesterol no esterificado es un dato de gran interés que ha sido ampliamente utilizado como una medida indirecta de la actividad LCAT. Nosotros hemos estudiado este cociente tanto en HDL (donde tiene lugar la acción de la LCAT) (figura nº 12) como en plasma (figura nº 13). Esta última es de gran interés ya que refleja el trasiego de colesterol en las HDL y otras lipoproteínas que tiene lugar tras la acción de la LCAT.

En HDL, el valor del cociente CE/CL aumentó inmediatamente tras la instauración de la lactancia y se mantuvo después. A pesar del incremento el valor supone un 50% del encontrado en adultos. Los neonatos prematuros presentaban un valor ligeramente inferior a los normales al nacimiento, valor que apenas se modificó en los días posteriores. En el caso de los CIR al nacimiento presentan valores del cociente menores que los de los prematuros pero se incrementan a lo largo de la semana de vida, siendo significativamente supreriores a los de prematuros al séptimo día de vida pero menores que los normales.

En plasma, el cociente muestra en los normales un aumento significativo al tercer día, mientras que en prematuros y CIR se mantiene significativamente por debajo de los normales.

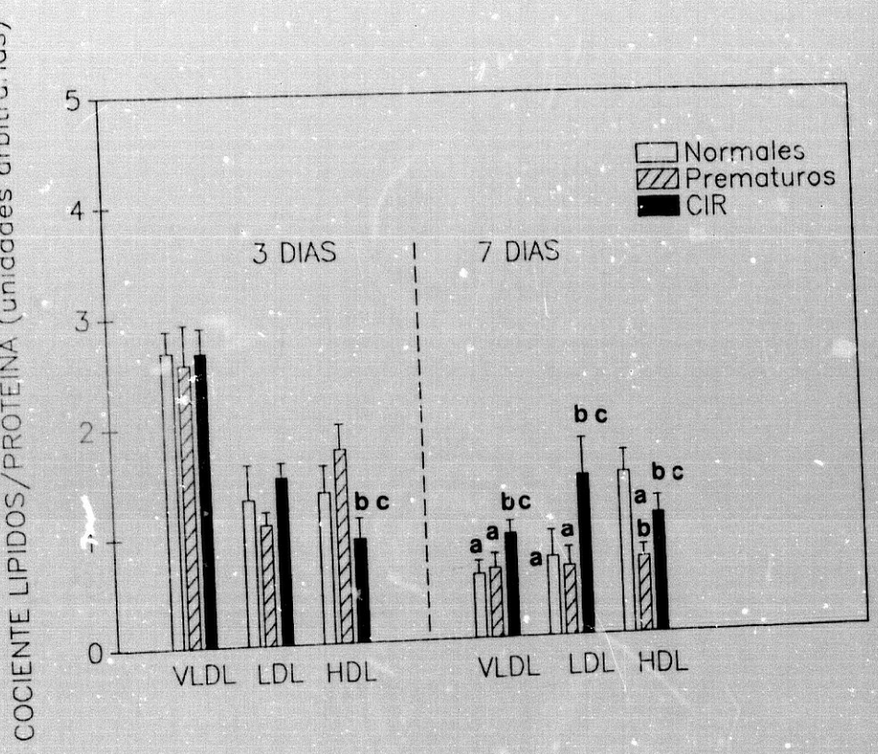

Figura nº 8.- Cambios en la composición relativa de lípidos y apolipoproteínas en fracciones lipoprotéicas aisladas de neonatos. Los resultados son media ± desviaciones estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; b, frente al grupo normal; c, frente al grupo de prematuros.

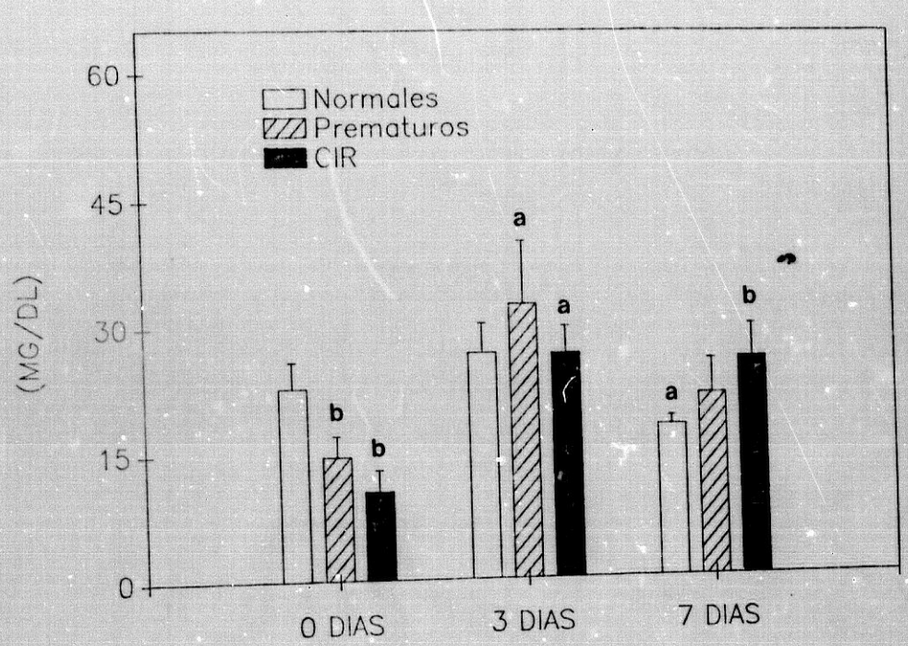

Figura nº 9.- Concentración de triglicéridos en VLDL de neonatos. Los resultados se expresan como medias ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; b, frente al grupo normal; c, frente al grupo de prematuros.

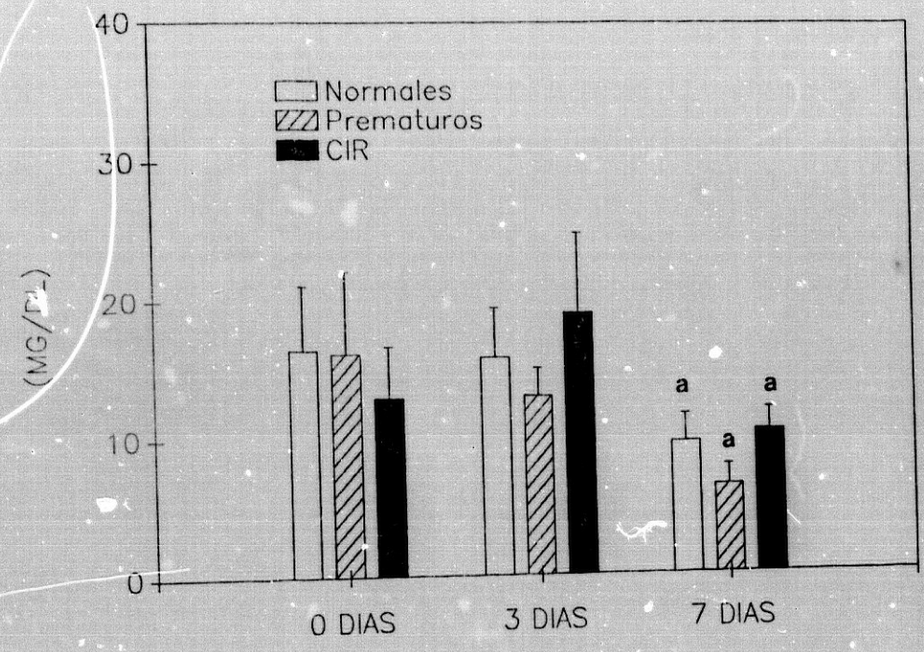

Figura nº 10.- Concentración de triacilglicéridos en IDL de neonatos. Los resultados se expresan como medias ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; b, frente al grupo normal; c, frente al grupo de prematuros.

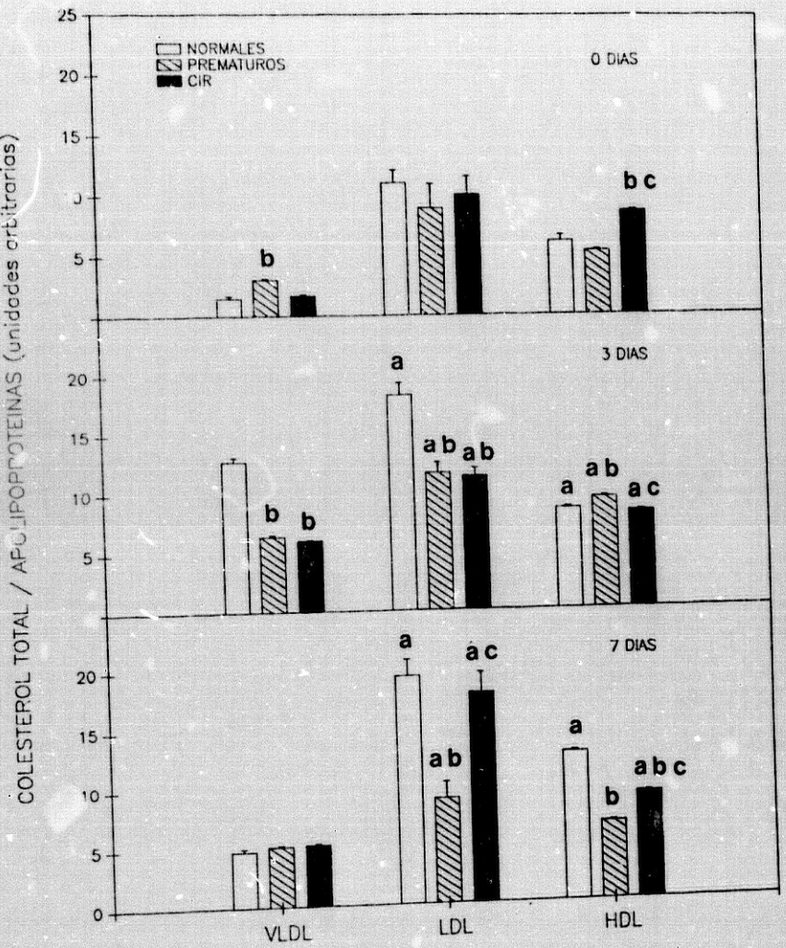

Figura nº 11.- Composición relativa en colesterol de fracciones lipoprotéicas aisladas. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; b, frente al grupo normal; c, frente al grupo de prematuros.

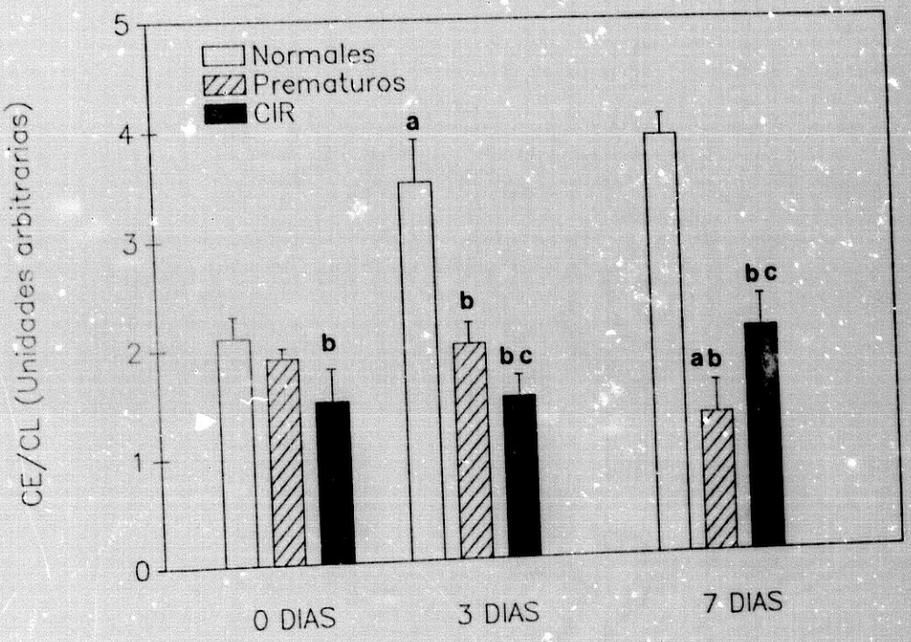

Figura nº 12.- Cociente colesterol esterificado (CE) / colesterol no esterificado (CL) en HDL aisladas de diferentes grupos de neonatos durante la primera semana de vida. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; b, frente al grupo normal; c, frente al grupo de prematuros.

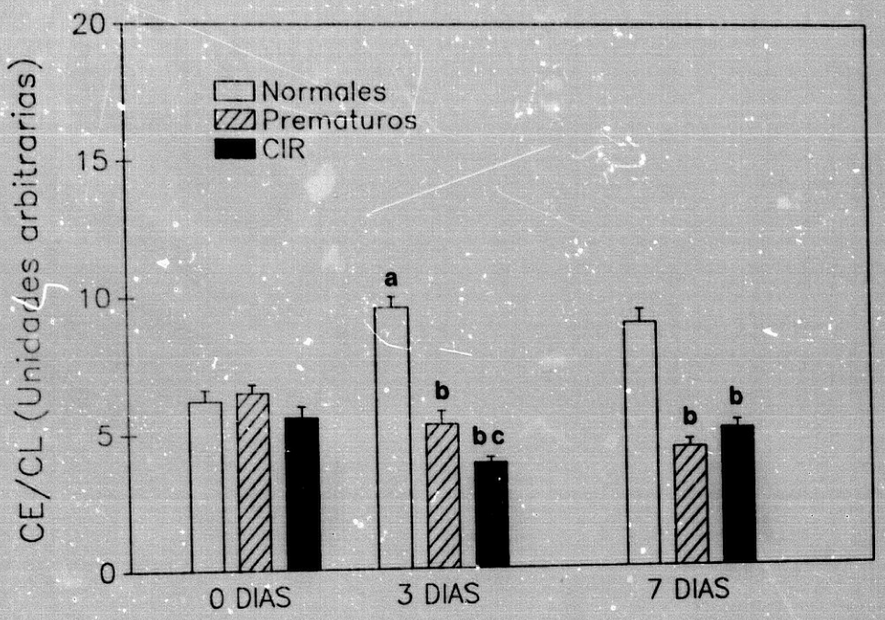

Figura nº 13.- Cociente colesterol esterificado (CE) / colesterol no esterificado (CL) en plasma de neonatos durante la primera semana de vida. Los resultados se expresan como medias ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; b, frente al grupo normal; c, frente al grupo de prematuros.

IV.2.4.- Concentración y composición de apolipoproteínas

IV.2.4.1.- Apolipoproteínas totales:

Con relación a adultos, la concentración de apolipoproteínas supone el 80% en VLDL, el 50% en LDL y el 80% en HDL. El contenido total de apolipoproteínas apenas se modifica durante los días que siguen al nacimiento en los neonatos normales, pero aumenta ligeramente en los CIR (figura nº 14).

IV.2.4.2.- Composición protéica:

La separación electroforética de las apolipoproteínas contenidas en las fracciones VLDL y HDL se muestra en las figuras 15, 16 y 17. Las LDL fueron igualmente analizadas (resultados no incluidos).

A diferencia de los adultos, las LDL presentan un alto contenido en apo E además de la apo B_{100}. No se observó en ningún caso la existencia de apo B_{48}. A los 7 días de vida la composición en apolipoproteínas es muy similar en todos los neonatos si bien se detectan diferencias en la distribución de apo A-I y Apo E. En los CIR se observó un mayor contenido en apo E en VLDL y un descenso relativo en HDL. En los prematuros la mayoría de la apo E se encuentra en la HDL. Por lo que respecta a la apo A-I, en los CIR los niveles no son apreciables en VLDL aunque normales en HDL.

Dado el efecto estimulador de la apo A-I sobre la LCAT, se procedió a la determinación cuantitativa de apo A-I en HDL (tabla nº 5) conformándose los datos electroforéticos. Si bién, al nacimento, los neonatos de bajo peso presentan valores ligeramente disminuídos, ni a los 3 ni a los 7 días se observaron diferencias significativas.

La apoproteína B no pudo ser analizada simultaneamente por no entrar en el gel poliacrilamída. Su determinación se hizo inmunologicamente.

En la figura nº 18 se muestran los resultados de la determinación de apolipoproteína B. En relación a los adultos, la concentración en neonatos es menor al nacimiento, aumenta al tercer día y luego vuelve a descender. Este perfil de cambios es diferente en el caso de neonatos de bajo peso observándose niveles muy altos de apo B durante la primera semana de vida.

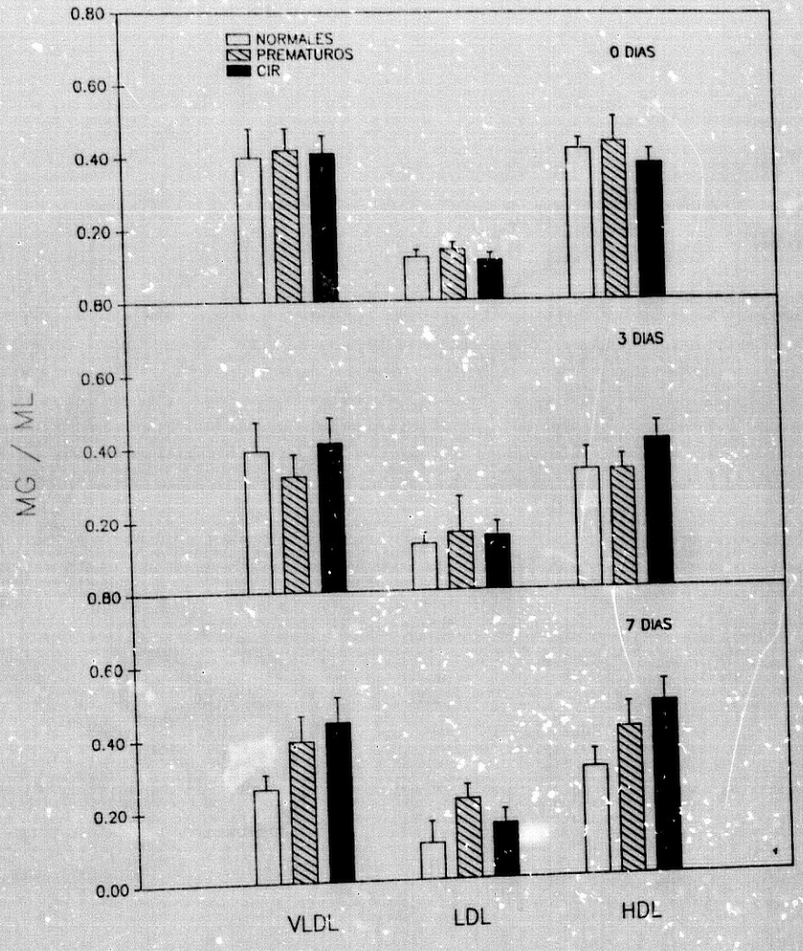

Figura nº 14.- Concentración de apolipoproteínas totales en fracciones lipoprotéicas aisladas. Los resultados son media ± desviación estándar.

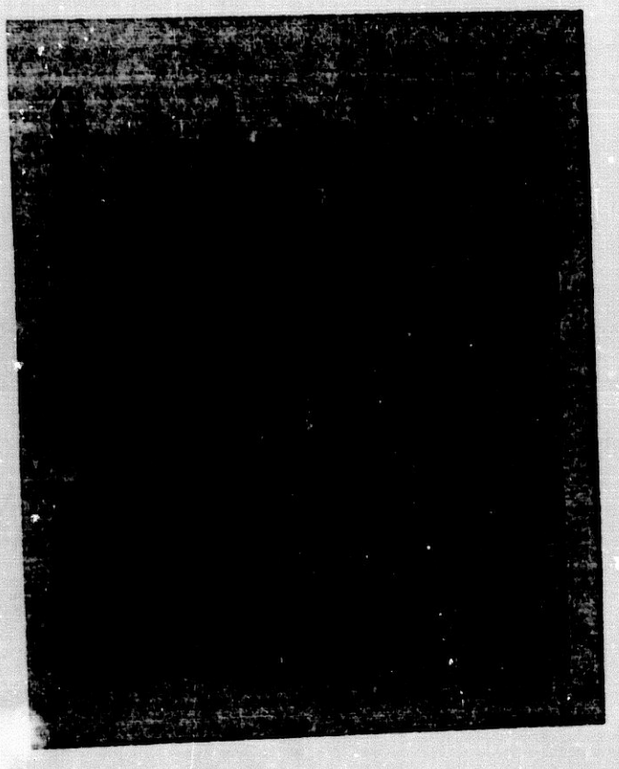

Figura nº 15.- Composición en apoproteínas en fracciones aisladas de neonatos normales de 7 días de edad. Electroforesis en gel de poliacrilamida-glicerol. Tinción con azul cromasie. 15 μg de proteína fueron aplicados en cada línea. Línea 1=marcadores de peso molecular, línea 2=VLDL neonatos alimentados con fórmula conteniendo nucleótidos, línea 3=HDL neonatos alimentados con fórmula conteniendo nucleótidos, línea 4=VLDL neonatos alimentados con fórmula sin nucleótidos, línea 5=HDL neonatos alimentados con fórmula sin nucleótidos.

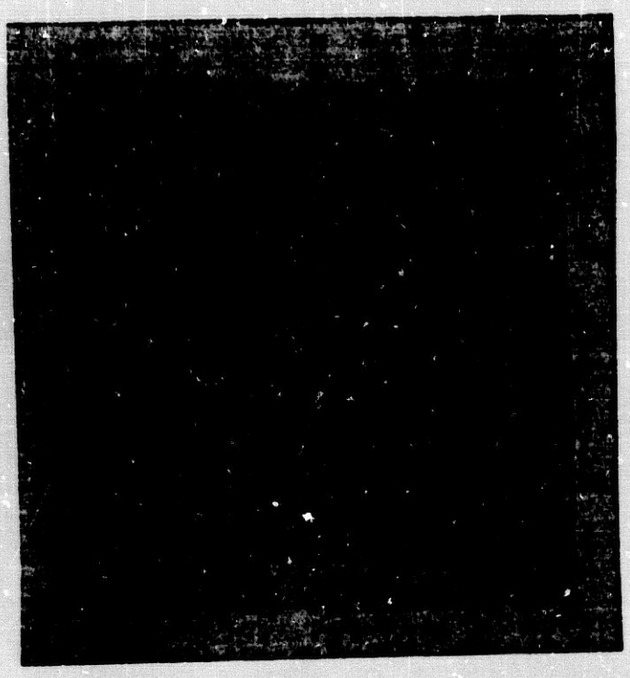

Figura nº 16.- Composición en apoproteínas en fracciones lipoprotéicas aisladas de neonatos prematuros de 7 días de edad. Electroforesis en gel de poliacrilamida-glicerol. Tinción con azul cromasie. 15 μg de proteína fueron aplicados en cada línea. Línea 1=marcadores de peso molecular, línea 2=VLDL neonatos alimentados con fórmula conteniendo nucleótidos, línea 3=HDL neonatos alimentados con fórmula conteniendo nucleótidos, línea 4=VLDL neonatos alimentados con fórmula sin nucleótidos, línea 5=HDL neonatos alimentados con fórmula sin nucleótidos.

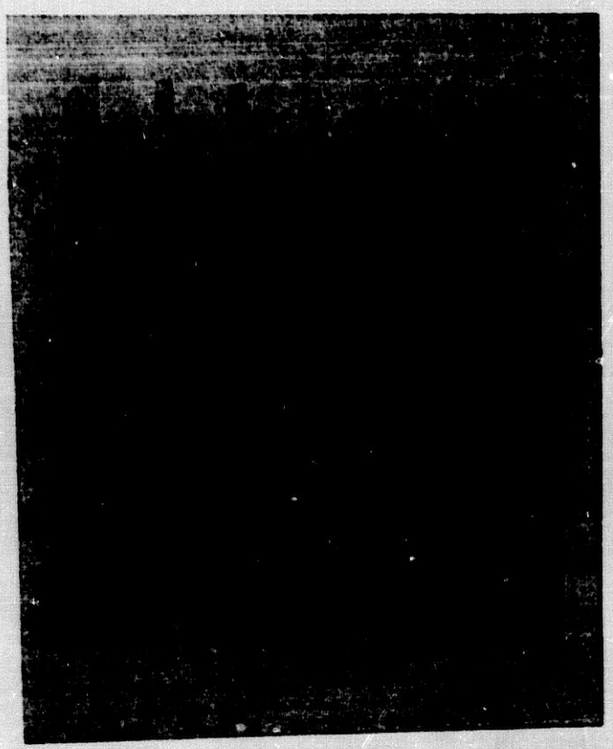

Figura nº 17.- Composición en apoproteínas de fracciones lipoprotéicas aisladas de neonatos CIR de días de edad. Electroforesis en gel de poliacrilamida-glicerol. Tinción con azul cromasie. 15 µg de proteína fueron aplicados en cada línea. Línea 1=marcadores de peso molecular, línea 2=VLDL neonatos alimentados con fórmula conteniendo nucleótidos, línea 3=HDL neonatos alimentados con fórmula conteniendo nucleótidos, línea 4=VLDL neonatos alimentados con fórmula sin nucleótidos, línea 5=HDL neonatos alimentados con fórmula sin nucleótidos.

Tabla nº5. - Concentración de apo A_I en HDL. Los resultados se expresan en g/l y som media ± DS de al menos 6 determinaciones.

	NORMALES	PREMATUROS	CIR
0 DIAS	5.7 ± 0.9	5.4 ± 0.9	5.2 ± 0.4
3 DIAS	5.3 ± 0.8	5.4 ± 0.8	5.5 ± 1.0
7 DIAS	4.9 ± 1.4	6.2 ± 1.5	5.6 ± 1.2

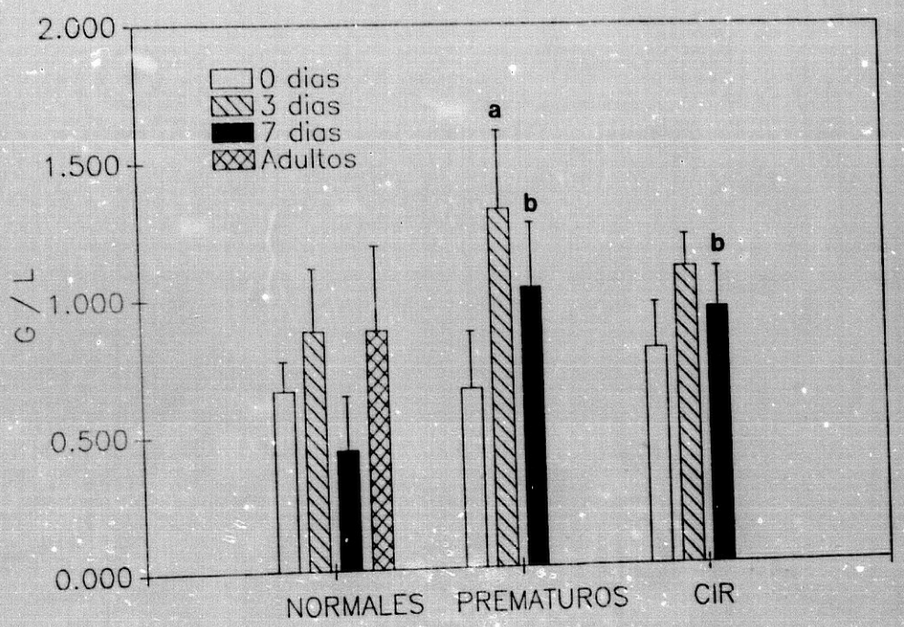

Figura nº 18.- Concentración plasmática de apolipoproteína B. Los resultados son media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; b, frente al grupo normal; c, frente al grupo de prematuros.

IV.3.- Efecto de los nucleótidos.

Los niveles de colesterol total plasmático en los distintos grupos de neonatos alimentados con fórmulas conteniendo nucleótidos no fueron diferentes de los encontrados en los alimentados con fórmulas sin nucleótidos (tabla nº 6). En el grupo CIR se observó una ligera tendencia al alza, no significativa.

Los niveles de las lipoproteínas no se vieron modificados ni en los normales ni en los CIR. En prematuros, se encontraron, sin embargo mayores niveles de HDL en los alimentados con nucleótidos (figura nº 19).

Por lo que respecta a la composición lipídica de las lipoproteínas, ni la concentración de triglicéridos ni la de colesterol se modificó de forma significativa en VLDL y LDL (resultados no incluidos). El contenido relativo en colesterol esterificado merece una atención especial. En los prematuros alimentados con nucleótidos el valor del cociente CE/CL fue similar al normal tanto en plasma (figura nº 20) como en HDL (figura nº 21). Representa, pues, un gran aumento con relación a este grupo de niños con alimentación sin nucleótidos. En los CIR, aunque se observó un aumento similar, este fue cuantitativamente menos importante.

La alimentación con nucleótidos indujo un aumento generalizado de las apolipoproteínas (figuras 22, 23 y 24). En VLDL se observaron mayores niveles de apolipoproteínas en prematuros y normales. En las LDL, el aumento es significativo en prematuros y CIR. En HDL el incremento es especialmente notable en los prematuros. Además, encontramos que en los CIR alimentados con nucleótidos los niveles de apo A-I en HDL estaban significativamente incrementados (figura nº 25). La alimentación con nucleótidos originó también un mayor contenido en apo A-I en VLDL de neonatos CIR y una mayor cantidad del complejo apo E-A-IV en las HDL de prematuros. (figuras 16 y 17).

En resumen, la alimentación con nucleótidos originó un aumento en lipoproteínas ricas en proteína. Una confirmación adicional a este hecho fue el hallazgo de formas más pequeñas al microscopio electrónico que se corresponden a formas similares a las HDL encontradas en adultos (figura nº 26).

Tabla nº6. - Niveles de colesterol plasmático en neonatos alimentados con fórmulas conteniendo nucleótidos.

Los resultados se expresan en mg/dl de plasma y como porcentaje del valor de neonatos alimentados con fórmulas carentes de nucleótidos y son media ± DS.

	3 DIAS		7 DIAS	
	mg/dl	%	mg/dl	%
NORMALES	93 ± 5	98 ± 5	105 ± 13	98 ± 12
PREMATUROS	108 ± 4	104 ± 5	112 ± 6	108 ± 3
CIR	119 ± 7	108 ± 6	126 ± 9	118 ± 8

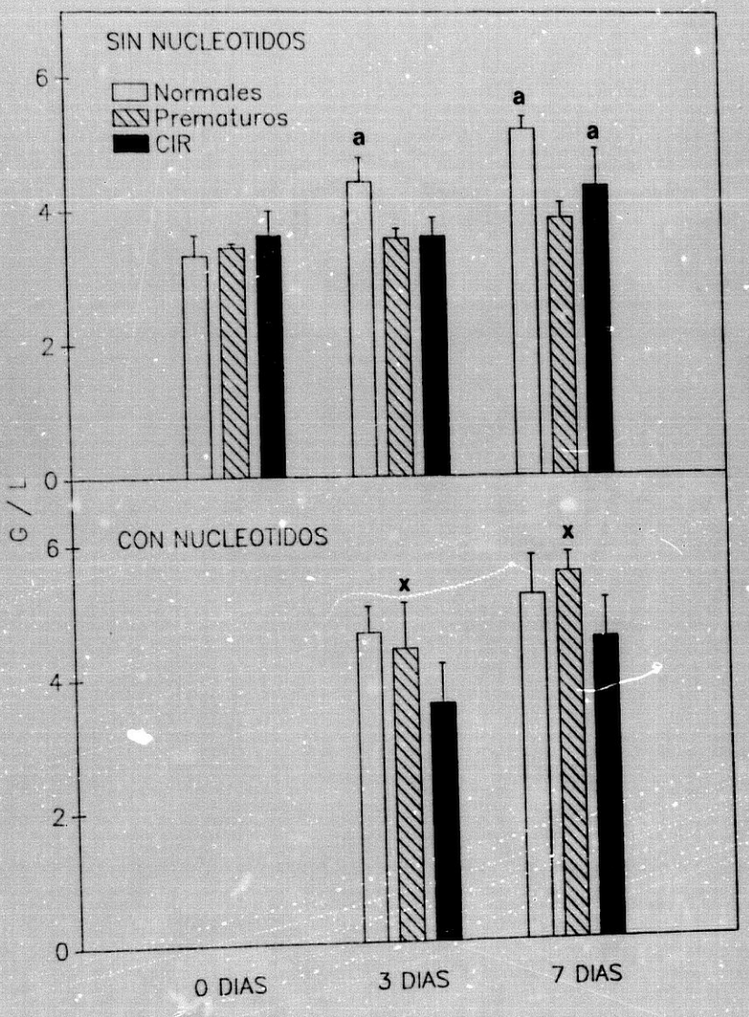

Figura nº 19.- Efecto de los nucleótidos sobre los niveles de HDL. Los valores son media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; x, frente al grupo SIN.

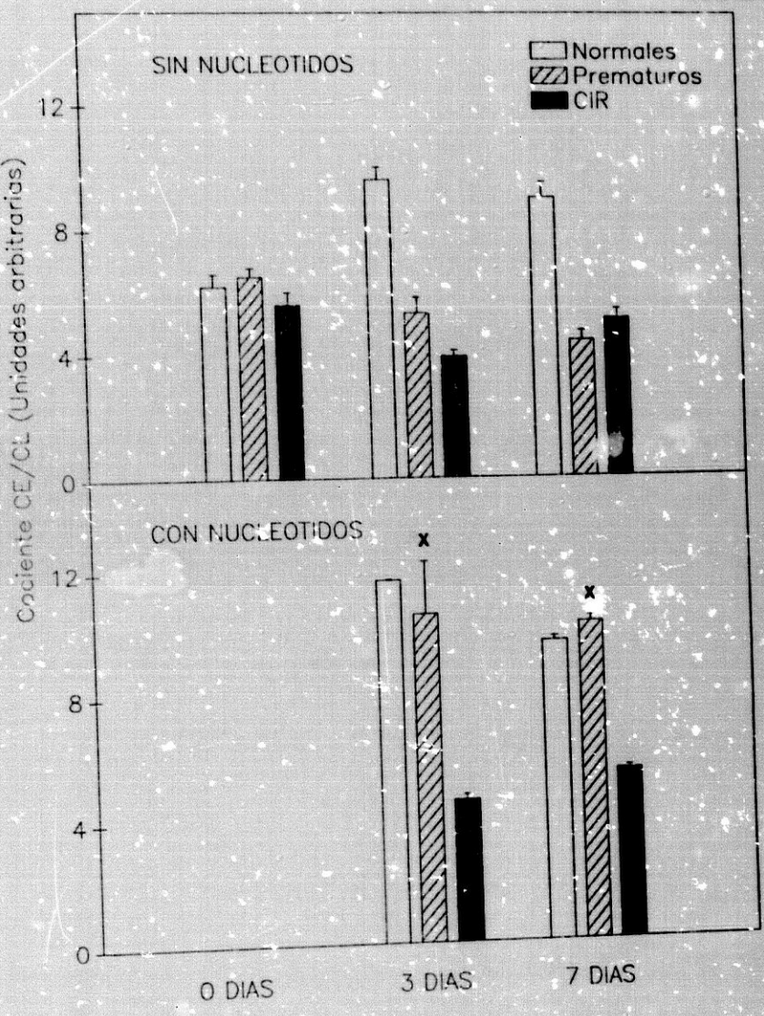

Figura nº 20.- Cociente colesterol esterificado (CE) / colesterol no esterificado (CL) en plasma de neonatos alimentados con fórmulas conteniendo nucleótidos. Los valores son media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: x, frente al grupo SIN.

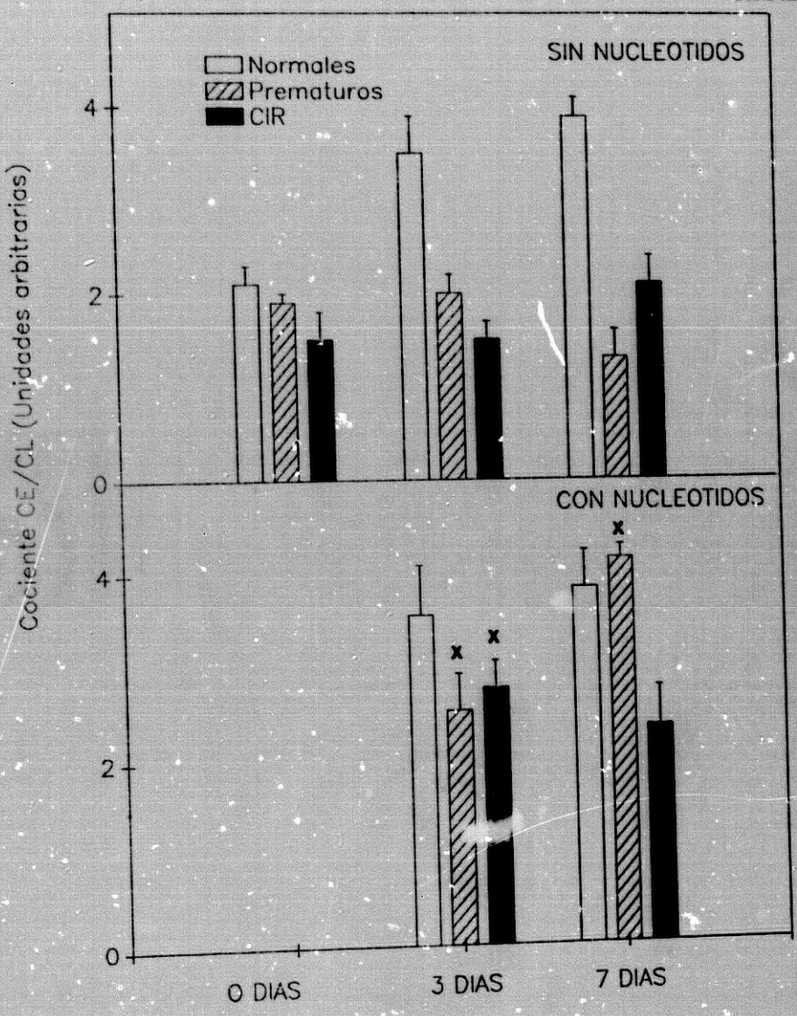

Figura nº 21.- Cociente colesterol esterificado / colesterol no esterificado en HDL de neonatos alimentados con fórmulas conteniendo nucleótidos. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: x, frente al grupo SIN.

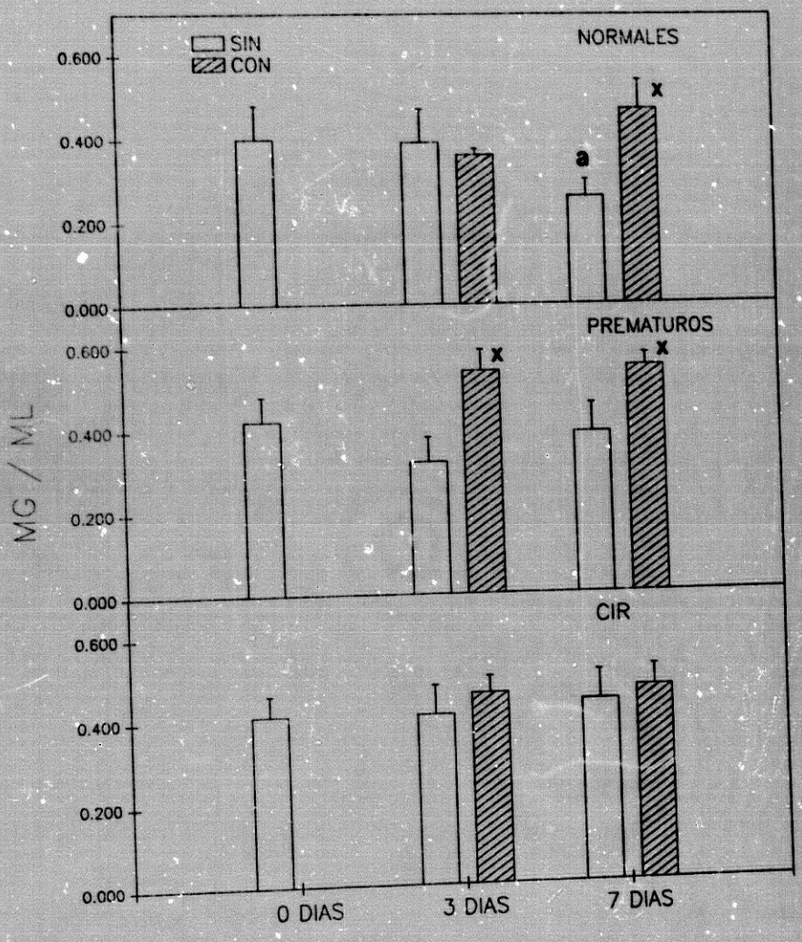

Figura nº 22.- Concentración de apolipoproteínas en VLDL aisladas de neonatos durante la primera semana de vida. SIN=neonatos alimentados con fórmulas carentes de nucleótidos; CON=neonatos alimentados con fórmulas conteniendo nucleótidos. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; x, frente al grupo SIN.

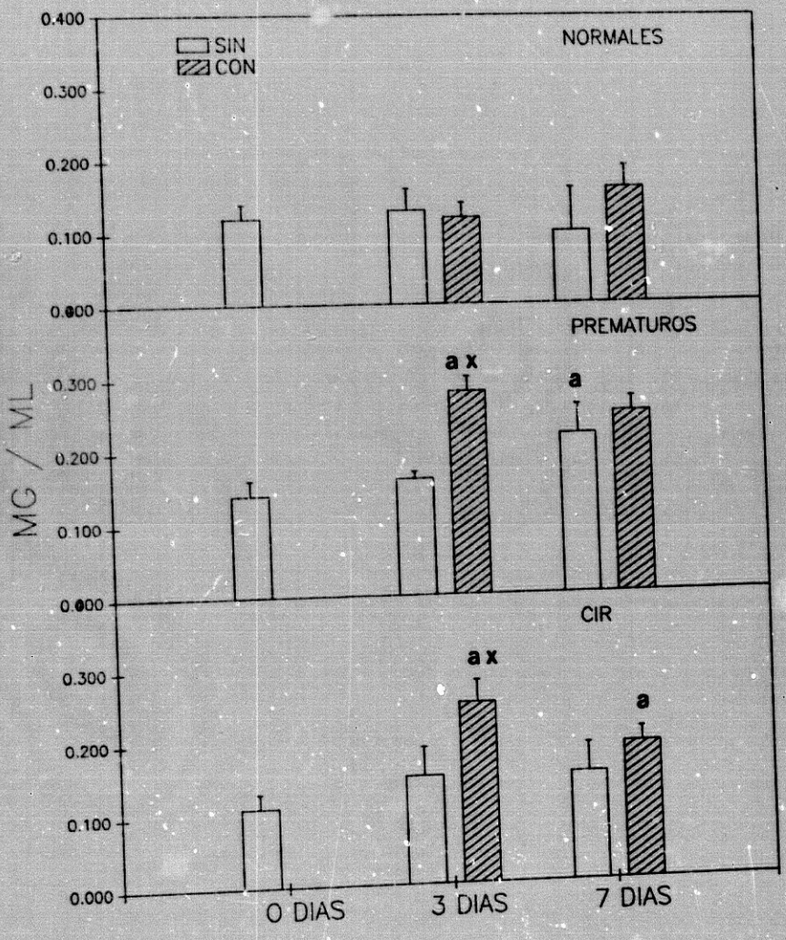

Figura nº 23.- Concentración de apolipoproteínas en LDL aisladas de neonatos durante la primera semana de vida. SIN=neonatos alimentados con fórmulas carentes de nucleótidos; CON=neonatos alimentados con fórmulas conteniendo nucleótidos. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; x, frente al grupo SIN.

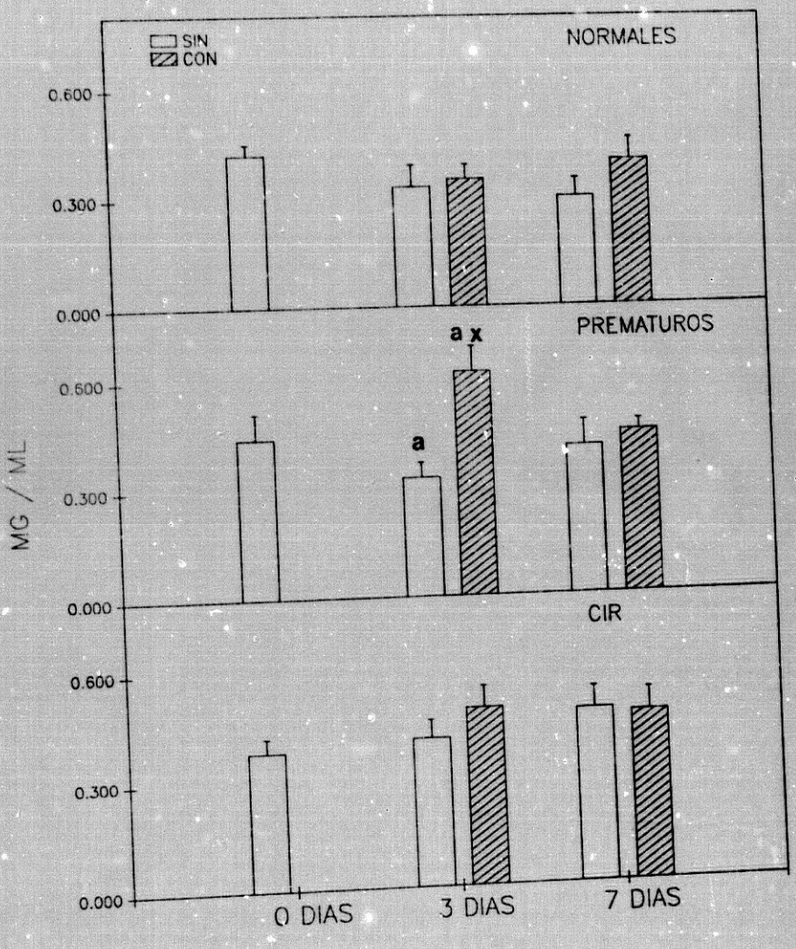

Figura nº 24.- Concentración de apolipoproteínas en HDL aisladas de neonatos durante la primera semana de vida. SIN=neonatos alimentados con fórmulas carentes de nucleótidos; CON=neonatos alimentados con fórmulas conteniendo nucleótidos. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; x, frente al grupo SIN.

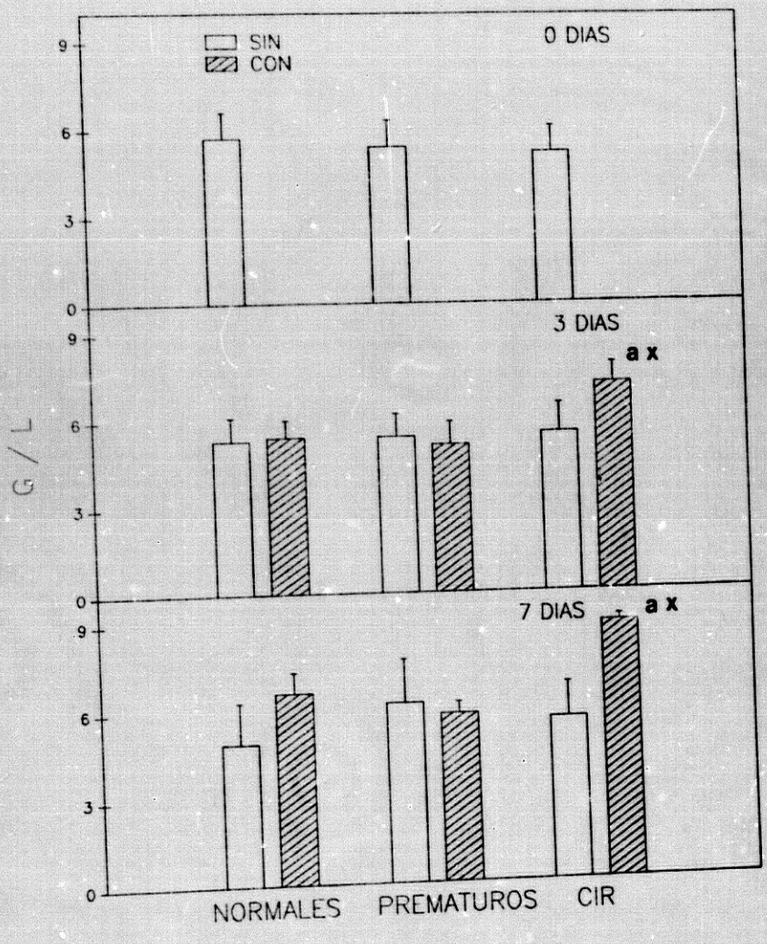

Figura nº 25.- Concentración de Apo A-I en HDL de neonatos. Los resultados son media ± desviación estándar. Los neonatos fueron alimentados con fórmulas carentes de nucleótidos (sin) o conteniendo nucleótidos (con). Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente al grupo normal; x, frente al grupo alimentado sin nucleótidos.

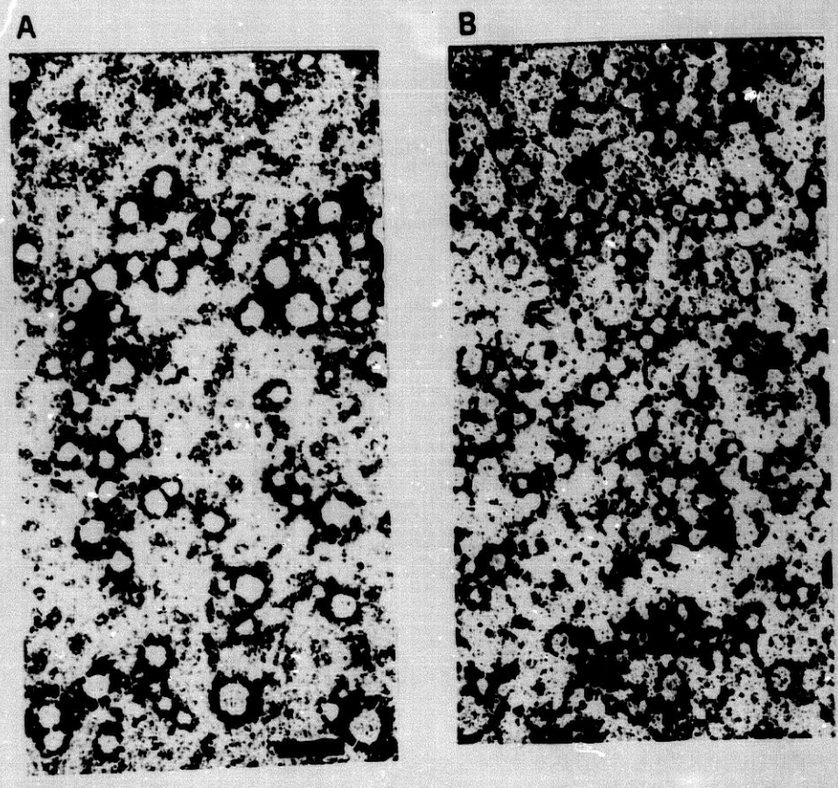

Figura nº 26.- Microscopía electrónica de HDL aisladas de neonatos prematuros de 7 días de edad. A: alimentados con fórmulas sin nucleótidos, B: alimentados con fórmulas con nucleótidos. En la fotografía 1 cm. equivale a 2.6 µm.

IV.4. Determinaciones complementarias

En la figura nº 27 se muestran los cambios en el peso y la influencia de los nucleótidos. La evolución del peso en todos los grupos estudiados fue normal no apreciándose diferencias significativas.

Teniendo en cuenta la gran repercusión de la ingesta energética sobre el metabolismo de las lipoproteínas, se controlaron las ingestas de calorias diariamente. La cantidad aumentó progresivamente desde 30 ± 4 kcal/kg el primer dia hasta 93 ± 7 kcal/kg al séptimo dia. No existen diferencias significativas entre los distintos grupos dado que en el estudio se procuró dar la misma energia y anular esta variable.

Los valores de glucemia en los distintos grupos de neonatos se muestran en la figura nº 28. No se observaron diferencias significativas exepto en los neonatos CIR al tercer dia de vida.

Se han determinado la urea y las proteinas plasmáticas como marcadores de la nutrición proteica de los neonatos. La urea aumenta cuando los aminoácidos están siendo utilizados con fines energéticos y disminuye cuando se utilizan para biosintesis de otros componentes. Las proteinas plasmáticas, especialmente la albúmina es también sensible a la malnutrición proteica.

Los resultados se exponen en las figuras 29 y 30 y en la tabla nº 7. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de niños. La administración de nucleótidos tampoco modificó significativamente los valores de urea, aunque parecen elevar los de albúmina en los neonatos de bajo peso. Estos resultados sin embargo no se traducen en un aumento en las proteinas totales por lo que son de dificil interpretación.

La determinación de ácido úrico como indice del metabolismo de las purinas no reveló ninguna diferencia significativa.

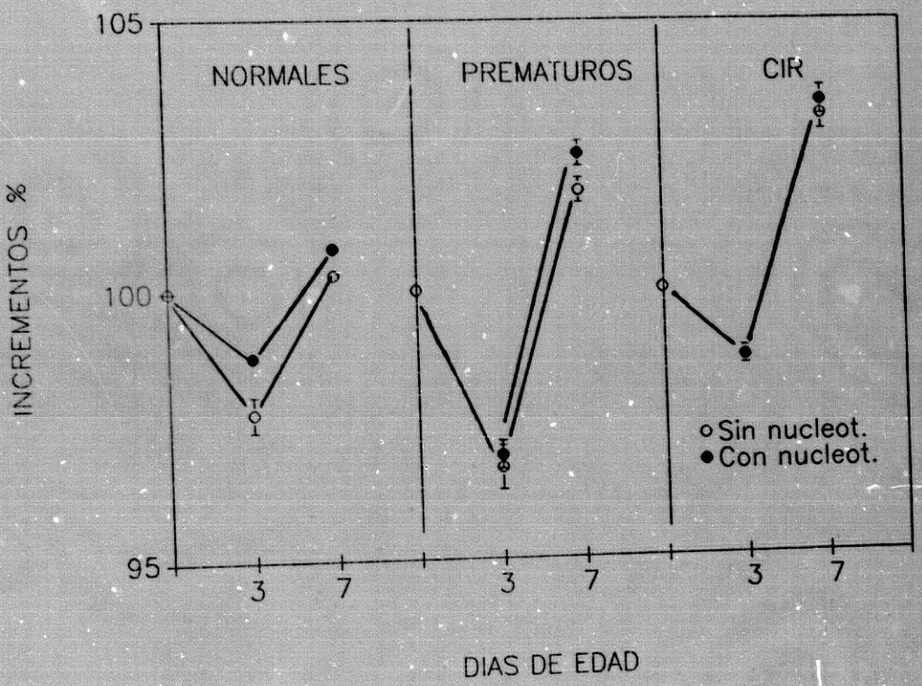

Figura nº 27.- Evolución del peso de los neonatos durante la primera semana de vida. Se representan los cambios con relación al peso de nacimiento considerado como 100%. Los resultados son media ± DS.

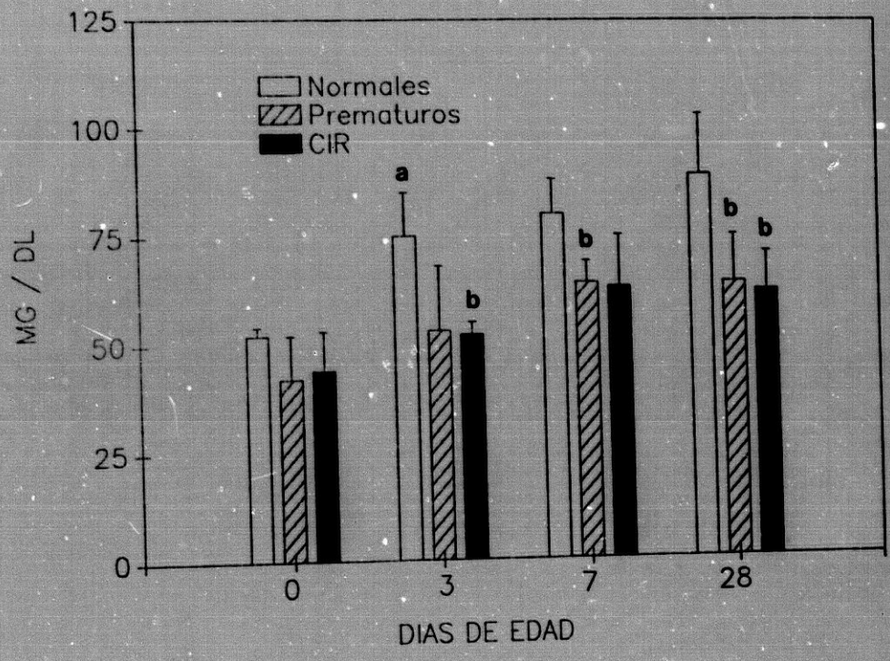

Figura nº 28.- Niveles de glucosa en sangre de neonatos de diferentes edades. Los resultados son media ± DS. Las diferencias estadisticamente significativas ($p<0.05$) se indican como sigue: a, frente a la edad anterior; b, frente al grupo normal.

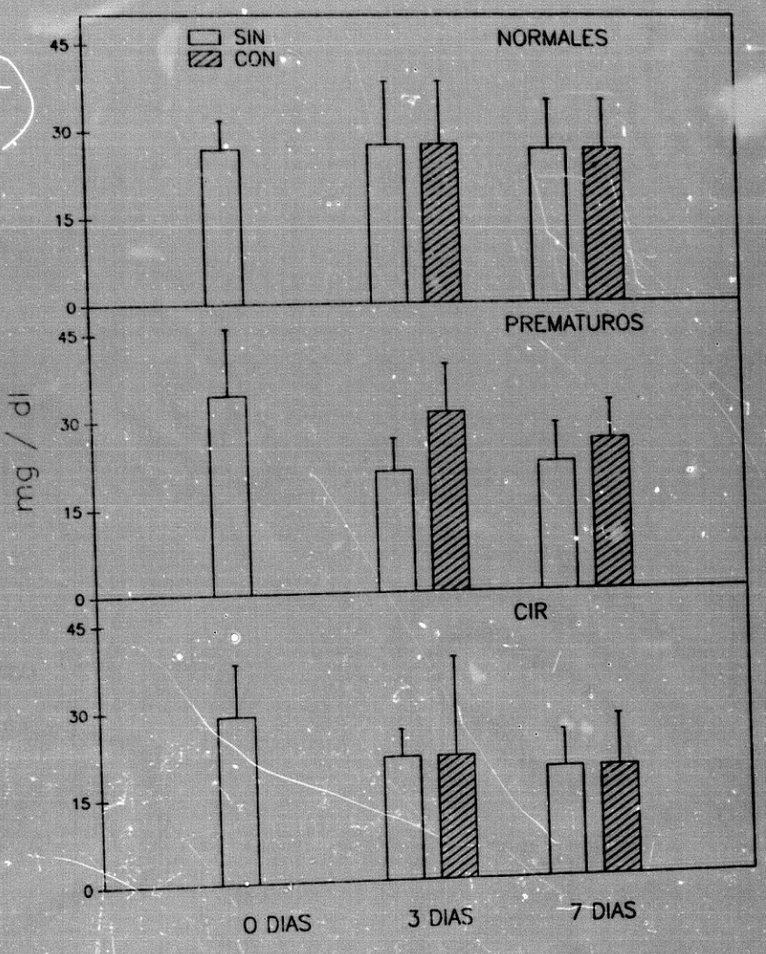

Figura nº 29.- Concentración de urea en plasma en neonatos normales y de bajo peso. Los resultados se expresan como media ± DS.

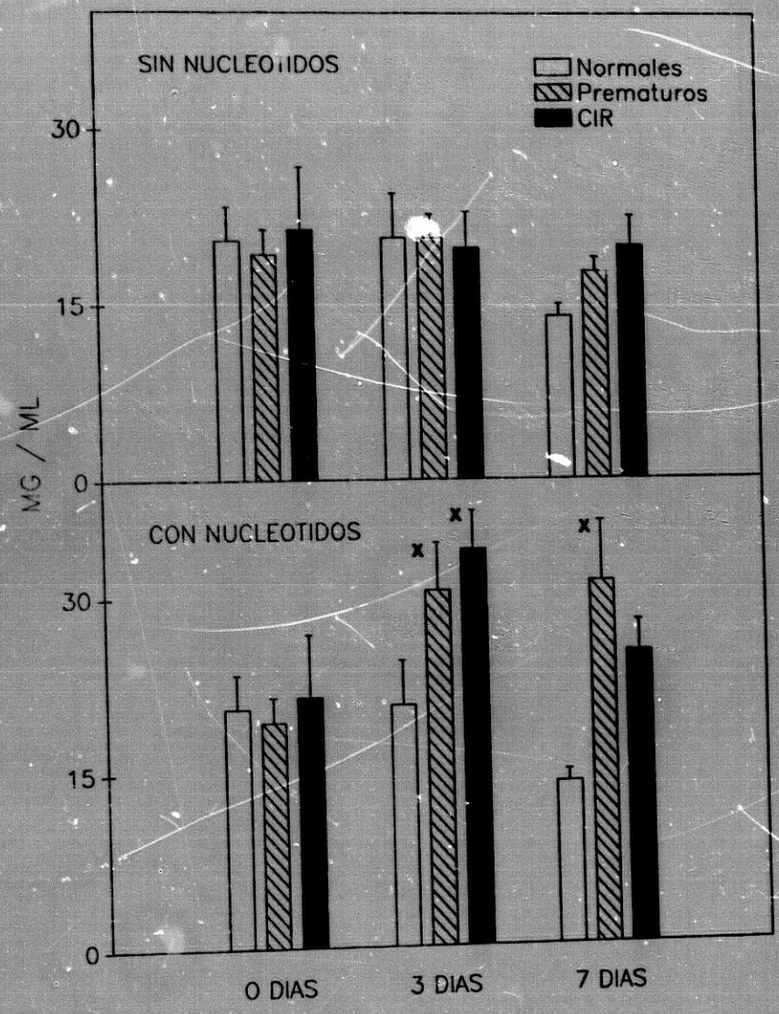

Figura nº 30.- Niveles de albúmina plasmática en neonatos normales y de bajo peso: efectos de la edad y la dieta. Los resultados se expresan como media ± DS. Las diferencias estadisticamente significativas se indican como sigue: x, frente al grupo SIN.

Tabla nº 7. - Concentración plasmática de proteínas totales en neonatos a lo largo de la primera semana de vida.

Sin=fórmulas sin nucleótidos; con=fórmulas con nucleótidos. Los resultados se expresan como media ± DS.

		0 DIAS	3 DIAS	7 DIAS
NORMALES	sin	62.7±11.8(13)	62.1±4.7(6)	61.1±7.9(4)
	con		57.3±8.3(5)	67.9±4.2(4)
PREMATUROS	sin	58.9±5.1(10)	56.4±2.8(10)	60.2±4.9(5)
	con		58.4±2.5(5)	64.3±3.4(5)
CIR	sin	51.1±10.7(16)	52.8±3.2(9)	57.2±3.2(8)
	con		58.0±7.6(4)	69.2±2.8(5)

V.- DISCUSION

La evolución del peso así como todas las determinaciones complementarias efectuadas fueron similares entre los distintos grupos de niños estudiados y se encontraron dentro de los límites de normalidad.

V.1. Cambios en las lipoproteínas plasmáticas durante el periodo postnatal temprano.

En todos los neonatos estudiados, las concentraciones de lípidos plasmáticos, y en consecuencia de lipoproteinas, son sensiblemente menores que en adultos. Tras el nacimiento, las concentraciones aumentaron rápidamnete, tal y como han descrito otros autores (Andersen et al., 1979; Ginsburg y Zetterström, 1980; Lane y McConathy, 1986; Rosseneu et al., 1983; Van Bierlviet et al., 1986). Hemos observado que el gran aumento de lípidos plasmáticos tiene lugar al tercer dia de vida. Este hecho ha sido pasado por alto en otros estudios en donde se no se ha estudiado el metabolismo antes de los 7 dias de vida. En nuestra opinión y en la de algunos otros investigadores (Van Biervliet et al., 1980,1981; Davis y Forte, 1982; Kirstein et al., 1985) ello indica que, aunque en la etapa postnatal pueden concurrir numerosos efectos relacionados con la adaptación a la vida extrauterina, especialmente los hormonales, los cambios en los lípidos parecen deberse fundamentalmente a la iniciación de la nutrición enteral. Efectivamente, en muestras tomadas a las 3 horas de vida y antes de administrar la leche se observaron

niveles de lípidos similares a los encontrados en la sangre de cordón umbilical.

No se han observado diferencias entre los neonatos normales y los de bajo peso en relación a la concentración total de lípidos plasmáticos y, especialmente, en la concentración de colesterol. A pesar de ello, se han podido establecer claras diferencias en los niveles de las principales fracciones lipoproteicas. Al ser mayor nivel de VLDL y menor de HDL, no es de estrañar que los niveles de colesterol total plasmático no difieran en los neonatos de bajo peso de los normales lo que ha determinado que en trabajos previos estos cambios hayan pasado desapercibidos.. Por tanto, la concentración de colesterol plasmático no parece ser un índice que permita identificar la influencia de la edad gestacional y peso al nacimiento en el metabolismo lipoproteico neonatal temprano.

V.1.1. Cambios en las VLDL.

Durante la primera semana de vida hemos observado que los cambios más importantes en las concentraciones de lipoproteinas plasmáticas tienen lugar en las VLDL.

Nuestras concentraciones de VLDL son ligeramente superiores a las descritas por otros autores estudiando neonatos alimentados al pecho; lo que se puede atribuir, por una parte, al empleo de

fórmulas, y por otra, a la instauración precoz de la lactancia. Al igual que nosotros, Lane y McConathy [1986] y Gouedard (Gouedard et al., 1982) describen un mayor contenido de TG a los 3 dias de vida en niños alimentados con fórmula con relación a los alimentados al pecho. Una posible explicación a estas diferencias es que el calostro a diferencia de las fórmulas contiene menos grasa. Asimismo, se sabe que la absorción de lactosa de las fórmulas es mayor que en la leche humana y por tanto el aporte calórico es mayor (Gil, 1989) lo que facilita la síntesis de VLDL (Gibbons, 1990).

Dado que en ningún caso se superan los valores encontrados en adultos, es de suponer, que el metabolismo de VLDL es rápido en la primera semana de vida si se tiene en cuenta la avalancha de lípidos de la dieta. En la rata, tambien se ha demostrado un elevado turnover lipoproteico inmediatamente postnatal cuyo significado es la compensación de la hipoglucemia neonatal (Fernando-Warnakulasuriya et al., 1983).

En neonatos de bajo peso, tanto prematuros como a término, se observaron mayores niveles de VLDL que en los normales al cabo de una semana de vida. Esta mayor cantidad de VLDL ha sido puesta de manifiesto mediante la determinación del contenido total de lipidos y proteinas en la fracción aislada y comprobada por determinación con anticuerpos específicos para la apolipoproteina B.

Aunque nuestros datos no permiten descartar que pudiera deberse a una mayor síntesis, nos inclinamos a pensar que se trata de una menor metabolización de las VLDL por la LPL. Está demostrado que los neonatos de bajo peso, tanto prematuros como a término, poseen una menor cantidad de tejido adiposo (Hahn, 1972; Hull, 1874) el cual es muy rico en LPL. En el primer caso la disminución obedece al nacimiento antes de que se desarrolle completamente el tejido adiposo; en el otro, a la malnutrición que hace que también se desarrolle poco por usarse los combustibles fetales para mantener la homeostasis energética. En nuestro estudio, hemos detectado que los niveles de HDL son menores en los neonatos de bajo peso, lo que puede considerarse como una indicación adicional del menor metabolismo de VLDL. En efecto, es un hecho demostrado que parte de las HDL proceden del metabolismo de las VLDL (Eisenberg, 1984).

Entre los neonatos de bajo peso, los CIR presentaron los mayores niveles de VLDL, lo que hace suponer que en estos recién nacidos la metabolización de las VLDL es aún más limitada.

V.1.2. Cambios en las LDL.

Los niveles de LDL apenas se modificaron durante la primera semana de vida en ninguno de los grupos estudiados. Los niveles de estas partículas permanecen muy bajos. La composición de las LDL de neonatos es marcadamente diferente de la encontrada en adultos. En primer lugar, estas LDL contienen una gran cantidad

de TG y, en segundo lugar, contienen apolipoproteina E. La composición de estas partículas se asemeja más a las IDL que a las LDL del adulto.

La presencia de IDL en el rango de densidad en el que normalmente se encuentran las LDL es posible dado que nosotros hemos realizado la separación a una densidad 1.102 g/ml y por tanto en este rango de densidad pueden encontrase este tipo de partículas. Estos cambios indican que la cantidad de LDL es muy escasa. La escasa cantidad de LDL podría estar relacionados con el elevado consumo de LDL en estos momentos donde se requiere gran cantidad de colesterol para la formación de membranas.

V.1.3. Cambios en las HDL.

En el recién nacido la fracción lipoproteica mayoritaria es la HDL. Con el tiempo se produce un incremento en la fracción LDL que es la predominante en el adulto. La iniciación de la lactancia (probablemente por la grasa) induce un incremento paulatino de lipoproteínas conteniendo apo B, primero VLDL, y al metabolizarse éstas, de LDL. Sin embargo, los cambios en las HDL no son tan pronunciados como los de VLDL tras el nacimiento y a diferencia de las LDL se mantienen relativamente constantes a lo largo de la vida (Tsang et al., 1981). Para muchos autores las HDL configuran un sistema distinto del de las VLDL-LDL tanto en sus funciones como en los factores que lo controlan.

En neonatos normales, las HDL aumentaron progresivamente durante la primera semana de vida. En neonatos prematuros apenas se observan incrementos y en los CIR se produce un discreto, pero significativo, aumento a partir del tercer dia de vida. Aunque se desconoce la base de estos cambios, la capacidad de síntesis de estas partículas por parte del hígado e intestino podría explicar la diferencia en la evolución a lo largo de la primera semana de vida. Así, en los prematuros debido a su mayor inmadurez hepática e intestinal la síntesis debe ser menor y en los CIR la malnutrición fetal puede estar frenando la síntesis. Esta síntesis aumenta cuando se instaura la alimentación enteral. Otro importante factor a considerar es la incorporación o transformación de los elementos superficiales de VLDL y QM en HDL tras la lipolisis por la LPL (Eisenberg, 1984). Los neonatos de bajo peso dada la aparente menor capacidad de metabolizar las VLDL tienen en consecuencia menores niveles de HDL aunque no se ha podido establecer si esta trasformación difiere entre los distintos neonatos de bajo peso.

En la etapa neonatal, los niveles de VLDL parecen jugar un papel importante en el metabolismo de las HDL. Al metabolizarse las lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL y QM) se generan elementos de superficie que son captadas por las HDL aumentando su tamaño. Sobre estas actúa la LCAT disminuyendo su densidad al esterificarse el colesterol. Estas últimas intercambian colesterol esterificado por triglicéridos con las VLDL a través de la CETP. Por último, los triglicéridos incorporados a las HDL

son hidrolizados por la HTGL hepática y el colesterol trasferido al hígado originando nuevas HDL de menor tamaño capaces de reiniciar de nuevo el ciclo. La transferencia de elementos entre VLDL y HDL es pués necesaria para la metabolización de las HDL.

En neonatos normales la escasa cantidad de VLDL hace que se acumulen HDL grandes (HDL_2) a diferencia de lo que se observa en el adulto en que la mayoria son HDL pequeñas (HDL_3). Los otros factores como la actividad LCAT y la actividad HTGL son similares a los del adulto (Lacko et al., 1972; Rovamo et al., 1984; Jain et al., 1985). En neonatos de bajo peso, las HDL presentan unas características diferentes en cuanto a la relación CE/CL que es muy baja comparada con la observada en los normales y la relación colesterol/proteína que es tambien muy baja. La presencia de este tipo de partículas sugiere una escasa actividad LCAT.

Se sabe que la actividad LCAT aumenta progresivamente durante la etapa fetal y tras el nacimiento (Jain, 1985; Andersen et al., 1977, 1979; Ginsburg y Zetterstrom, 1980). La menor actividad LCAT en prematuros ha sido demostrada por varios autores (Amar et al., 1988; Papadopoulos et al., 1988; Diaz et al., 1989) pero hasta ahora no se habia descrito una reducción similar en los nacidos a término CIR.

Es destacable que durante los primeros dias de vida, los prematuros mantienen bajos niveles de HDL con un cociente CE/CL bajo mientras que en los CIR tanto el nivel de HDL como el

cociente CE/CL aumenta desde el nacimiento. Estos resultados indican que el nivel de HDL tambien es un factor a considerar en el propio metabolismo de las HDL. El mayor nivel de sustrato para la LCAT facilita así el aumento observado en el cociente CE/CL. Otra posible explicación es que en los CIR exista mayor cantidad de LCAT que en los prematuros.

Nuestros resultados indican un fuerte aumento de dicha actividad tras la instauración de la alimentación enteral en los neonatos normales a término y menor en los de bajo peso aunque con una clara diferencia en cuanto a la evolución postnatal. Las consecuencias de estas diferencias son importantes. La enzima LCAT es la que controla, además de la esterificación del colesterol, el metabolismo plasmático de los fosfolípidos, de ahí que la administración parenteral de lípidos, cosa frecuente en prematuros, origina hiperfosfolipidemia (Papadopoulos et al., 1988).

Otra interesante consecuencia del trasiego de componentes entre VLDL y HDL son los cambios en ciertas apolipoproteinas como la apo E y la apo A-1. Proteinas de gran interés en el metabolismo de las lipoproteinas. La apo E interacciona con el receptor B,E y la apo Apo A-1 es el principal cofactor de la LCAT (Albers et al., 1986).

Durante la fase neonatal se han observado desplazamientos de la apolipoproteina E desde las HDL a las VLDL (Van Bierlviet

et al., 1986). Este intercambio se produce al mismo tiempo que se intercambian colesterol esterificado y triglicéridos entre HDL y VLDL. El factor limitante es de nuevo la disponibilidad de VLDL. Cuando los niveles de VLDL son bajos, como ocurre durante la fase fetal, la mayoría de la apo E se encuentra en las HDL. Estas partículas ricas en apo E pueden servir como sustitutos de las LDL para llevar colesterol a los tejidos que expresen el receptor apo B,E (Innearity et al., 1984). Al aumentar los niveles de VLDL tras el nacimiento, van disminuyendo paulatinamente a medida que aumentan las LDL que son en el adulto las principales transportadoras de colesterol a los tejidos.

Las HDL de neonatos CIR presentan los menores niveles de apo E entre todos los grupos estudiados debido probablemente al mayor nivel de VLDL. Las consecuencias de este hecho se desconocen.

La apo A-I total en plasma se encuentra en niveles más bajos en los neonatos que en los adultos (Lane y McConathy, 1986) pero sufre un fuerte aumento tras el nacimiento (McConathy y Lane, 1980). Nuestros resultados no muestran cambios significativos en el contenido en apo A-1 en HDL en ningún caso lo cual indica que también se distribuyen entre HDL y VLDL. A diferencia de prematuros y normales, en CIR, la apo A-I en VLDL es muy escasa y en HDL parece estar disminuída a juzgar por los datos obtenidos por electroforesis en geles de acrilamida. Por

otra parte, en los CIR se observó un mayor aumento de apo A-I que en los demás grupos durante los primeros dias de vida. Todo ello sugiere que estos neonatos presentan un déficit en apoproteína A-1 que puede explicarse por su malnutrición intrauterina y se compensa con una dieta adecuada.

El hallazgo de un contenido relativamente constante de apo A-1 en HDL indica que son los niveles de HDL los que determinan fundamentalmente la actividad esterificante. Estos resultados permiten explicar la no relación entre el contenido en apo A-1 total plasmática y la actividad LCAT descrita por otros autores (Amr et al,1988).

Finalmente, es interesante señalar que el sistema lipoproteico de los neonatos sea similar al de adultos de otras especies animales, con altos niveles de HDL y bajos niveles de LDL (Mills y Taylaur, 1971; Srinivasan et al., 1974; Tsang et al., 1974). En humanos, tras el nacimiento este sistema evoluciona hacia una elevación de LDL diferenciándose así de otras especies. Las razones de esta diferencia son desconocidas.

V.2. Efecto de los nucleótidos sobre el metabolismo neonatal de las lipoproteinas.

La alimentación con nucleótidos no modificó el nivel total de colesterol plasmático en ninguno de los grupos estudiados, pero produjo cambios significativos en las lipoproteínas de

recién nacidos prematuros, ligeras modificaciones en los nacidos a término pequeños para la edad gestacional y ningún efecto apreciable en los neonatos nacidos a término adecuados para la edad gestacional.

En prematuros se observó un aumento muy siginificativo de los niveles de HDL. Recuérdese que en estos niños se encuentran muy disminuidos con relación a los normales. Este aumento parece deberse a una mayor síntesis tal como se refleja por su mayor contenido de apolipoproteínas. Además, las HDL aisladas mostraron una relación colesterol/proteína disminuida indicando que el contenido en colesterol no se modificó y al microscopio electrónico se observaron HDL de menor tamaño que se corresponden típicamente con HDL de nueva síntesis. Otro factor adicional que facilita la sintesis de lipoproteínas y que parece afectarse por los nucleótidos es la síntesis de fosfolípidos. Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que los niveles de esta sustancia están incrementados en el hígado de ratas alimentadas con un suplemento nucleótidico (García Molina et al., 1989). La mayor cantidad de proteína junto con la de fosfolípidos permite así la formación de partículas más pequeñas.

El aumento en los niveles de HDL fue paralelo al del cociente CE/CL que alcanzó los valores de los niños normales. Tal como se ha discutido antes, este aumento indica una mejor metabolización de las HDL al incrementar la actividad LCAT, muy

disminuida estos neonatos. Los niveles de apo A-1 no se modificaron.

En los prematuros, la alimentación con nucleótidos también incrementó la concentración de apolipoproteínas en VLDL sin que se detectaran diferencias en la composición con relación a los alimentados sin nucleótidos. Ello sugiere que el efecto de los nucleótidos en prematuros afecta a más de una apolipoproteina. En otras palabras, es un efecto general sobre la síntesis de apolipoproteinas.

En neonatos con retraso del crecimiento intrauterino no se produjo aumento en los niveles de HDL. Sin embargo, al igual que en los prematuros, los nucleótidos parecen restablecer, aunque en menor grado, la normalidad en el metabolismo de las HDL. El claro aumento en los niveles de apo A-I puede ser el responsable a través de la activación de la LCAT del cociente CE/CL observado.

El efecto de los nucleótidos en niños prematuros y su escaso efecto sobre los nacidos a término sugiere que los nucleótidos de la leche pueden tener algún papel en la maduración del neonato. Se ha demostrado que la administración de nucleótidos favorece la maduración de las disacaridasas intestinales (Uauy, 1989) y asimismo que la recuperación del intestino y del hígado en diversas circunstancias experimentales tales como diarrea, ayuno severo, hepatectomia, etc (Núñez et

al., 1991; Ogoshi et al.,1988) es más rápido con dietas conteniendo nucleótidos que carentes de ellos.

Estudios previos realizados por nuestro grupo en neonatos de un més de vida (Sánchez-Pozo et al., 1986) mostraron un mayor nivel de HDL. Similares resultados se han obtenido en ratas alimentadas con nucleótidos (Garcia-Molina et al., 1991). Todo ello indica que en condiciones normales de desarrollo los nucleótidos pueden favorecer el metabolismo de las lipoproteinas aunque sus efectos son a más largo plazo.

En resumen, los nucleótidos de la leche mejoran sustancialmente el metabolismo de las lipoproteinas en recién nacidos, tanto más cuanto más inmaduros sean, lo que justifica su adición a las fórmulas adaptadas.

VI.- CONCLUSIONES

VI.1. La instauración de la nutrición enteral eleva los niveles de VLDL y determina un cambio en el sistema lipoproteico del neonato que, con ligeras modificaciones, se mantiene en el adulto.

VI.2. Tanto los niños prematuros como los nacidos a término pequeños para la edad gestacional presentan con relación a los nacidos a término adecuados para la edad gestacional durante los primeros dias de vida una limitada capacidad para metabolizar las VLDL debido, probablemente, a la menor masa de tejido adiposo.

VI.3. Los recién nacidos de bajo peso muestran un menor cociente colesterol esterificado/colesterol libre, sugiriendo una menor actividad del enzima lecitin colesterol acil transferasa. Los cambios en esta actividad parecen ser dependientes de los niveles de HDL. A diferencia de los niños prematuros, en los nacidos a término pequeños para la edad gestacional esta actividad aumenta rápidamente durante la primera semana de vida.

VI.4. A pesar de los cambios que se observan en las lipoproteinas, los niveles de colesterol total plasmático no difieren entre los distintos grupos de niños lo que indica que éste parámetro es de dificil interpretación en los neonatos.

VI.5. La adición de nucleótidos a las fórmulas lácteas adaptadas en recién nacidos prematuros produce: un aumento en las apolipoproteínas en todas las fracciones lipoproteicas, un aumento en el nivel de HDL y en el cociente colesterol esterificado/colesterol libre, lo que puede interpretarse como una mejora en el metabolismo de las lipoproteinas en estos niños.

VII.- AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

En primer lugar debo agradecer al Dr. Antonio Sánchez Pozo el interés, dedicación, tiempo empleado y sobre todo paciencia que ha tenido conmigo durante estos años en la dirección de esta tesis doctoral. Sus magníficos conocimientos y su inmejorable línea de investigación los ha puesto al servicio de un pediatra neonatologo. Hago extensivas las gracias al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular que puso a mi disposición las técnicas para la realización de las determinaciones y en especial a Juana Morillas por su excelente trabajo en el laboratorio.

A los doctores Angel Gil del Departamento de Bioquímica y Rafael Robles, jefe clínico de la unidad neonatal, gracias por su inestimable apoyo y colaboración en la realización de esta tesis.

Al Departamento de Pediatria, a nuestro jefe Dr. Jesús Moreno, por el estímulo y ayuda recibidos estos años.

La selección de los niños que constituye la base de este trabajo ha sido dificil. Esto no hubiera sido posible sin la participación muy activa de mis colegas neonatologos: Jose M. Cañizares, Antonio Gallego, Maria Dolores Linares, Francisco J. Romá y Manuel Samaniego. A los médicos residentes, supervisoras, ATS, diplomados de enfermeria y auxiliares de nuestra unidad neonatal muchas gracias.

A los padres que han permitido que el proyecto siguiese adelante y a todos nuestros recién nacidos tambien gracias.

Mi agradecimiento a la empresa Unión Industrial y Agroganadera S.A que suministró las fórmulas y ha sufragado gran parte de los gastos de este trabajo.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

Agostini, F.; Seidel, D. y Wieland, H. *Electron microscopy of low-density plasma lipoproteins in patients with type IIa hyperlipoproteinemia*. Die Naturwissenchaften, 1973. 2, p. 1-3.

Alaupovic, P. *Serum apolipoprotein profiles of dyslipoproteinemia*. En: Perkins EG, Visek WJ eds. Dietary fats and Health. Am. Oil Chem. Soc. Champaign IL, 1983. p. 574-97.

Albers, JJ.; Chen, CH. y Lacko, AG. *Isolation, characterization and assy of lecithin-cholesterol acyltransferase*. Methods Enzymol, 1986. 129, p. 763-783.

Amr, S.; Chowdhry, P.; Hamosh, P. y Hamosh, M. *Low levels of apolipoprotein A1 are not contributors to the low lecithin-cholesterol acyl transferase activity in premature newborn infants*. Pediatr. Res., 1988. 24, p. 191-193.

American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition. *Nutritional needs of low-birth-weight infants*. Pediatrics, 1985. 75, p. 976-986.

Andersen, GE.; Lous, P. y Friis-Hansen, B. *Hyperlypoproteinemia in newborns infants*. Acta Paediatr. Scand., 1979. 68, p. 683.

Andersen, GE.; Lifschitz, C. y Friis-Hansen, B. *Dietary habits and serum lipids during first 4 years of life. A study of 95 Danish children.* Acta Paediatr. Scand., 1966. 55, p. 353-62.

Andersen, GE. y Friis-Hansen, B. *Cord serum lipid and lipoprotein-cholesterol values in normal and betamethasone-treated newborns of varying gestational ages.* Acta Paediatr. Scand., 1977. 66, p. 355-60.

Andersen, GE. y Johansen, KB. *LDL receptor studies in term and preterm infants: measurements of sterol synthesis in cord blood lymphocytes.* Acta Paediatr. Scand., 1980. 69, p. 577-80.

Andersen, GE. y Friis-Hansen, B. *Hypercholesterolemia in the newborn: ocurrence after antepartum treatment with betamethasone-phenobarbital-riothidine for the prevention of the respiratory distress syndrome.* Pediatrics, 1978. 62, p. 8-12.

Andersen, GE. y Friis-Hansen, B. *Neonatal hypertriglyceridemia.* Acta Paediatr. Scand., 1976. 65, p. 369-74.

Anderson, M. *Diadenosine tetraphosphate (Ap4A): its presence and functions in biological systems.* Int. J. Biochem., 1989. 21, p. 707-714.

Andrew, G.; Chan, G. y Schiff, D. *Lipid metabolism in the neonate. III The ketogenic effect of intralipid infusion in the neonate.* J. Pediatr., 1978. 92, p. 995.

Andrew, G.; Chan, G. y Schiff, D. *Lipid metabolism in the neonate. I. The effects of Intralipid infusion on plasma triglyceride and free fatty acid concentrations in the neonate.* J Pediatr., 1976. 88, p. 273-8.

Argiles, J. y Herrera, E. *Lipids and lipoproteins in maternal and fetus plasma in the rat.* Biol. Neonate., 1981. 39, p. 37-44.

Auricchio, S.; Rubino, A. y Murset, G. Pediatrics, 1965. 35, p. 944-954.

Aynsley-Green, A. *Metabolic and endocrine interrelations in the human fetus and neonate.* Am J Clin Nutr., 1985. 41, p. 399-417.

Bard, H. *Neonatal problems of infants with intrauterine growth retardation.* J Reprod Med., 1978. 21, p. 356-64.

Bargen-Lockner, C.; Hahn, P.; Pendray, M. y Riddell, G. *Effect of intralipid on total and high-density lipoprotein cholesterol levels in newborns and infants.* Biol. Neonate., 1983. 44, p. 272-7.

Barness, LA. y Carver, J. *Dietary nucleotides and their possible role in immunity.* 3rd. International Symphosium on Infant Nutrition and Gastrointestinal Disease, Brussels, 1985.

Battaglia, FC.; Lubchenco, LO. *A practical Classification of new infants by weight and gestational age.* J. Pediatr., 1967. p. 71-159.

Berenson, GS.; Srinivasan, SR.; Frank, GC. y Webber, LS. *Serum lipid and lipoprotein in infants and children and their relationship with diet.* Prog. Clin. Biol. Res., 1981. 61, p. 73-94.

Biezenski, JJ. *Fetal lipid metabolism.* Obstet. Gynecol. Ann., 1975. 4, p. 39-70.

Bissell, DM. *Peculiar purine nucleotides and liver regeneration.* Gastroenterology, 1985. 89, p. 914-916.

Black, VD. y Lubchenco, LO. *Neonatal polycythemia and hyperviscosity.* Pediatr Clin North Am., 1982. 29, p. 1137-48.

Blanche, PJ.; Gong, EL.; Forte, TM. y Nichols, AV. *Characterization of human high density lipoproteins by gradient gel electrophoresis.* Biochim. Biophys. Acta, 1981. 665, p. 408-19.

Bloch, E. *Fetal adrenal cortex: function and steroidogenesis.* McKerns KW ed. Function of the adrenal cortex. Appleton-Century Crofts, 1968. p. 721-72.

Boellner, SE.; Beard, AG. y Panos, TC. *Impairment of intestinal hydrolysis of lactose in newborn infants.* Pediatrics, 1965. 36, p. 542.

Bond, JH. y Levitt, MD. *Fate of soluble carbohydrate in the colon of rats and man.* J. Clin. Invest., 1976. 57, p. 1158-64.

Bradford, MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.* Anal. Biochem., 1976. 72, p. 248-54.

Bradley, WA., Hwang, SL.; Karlin, JB.; Lin, AH.; Prasad, SC.; Gotto, AM. y Gianturco, SH. *Low-density lipoprotein receptor binding determinants switch from apolipoprotein E to apolipoprotein B during conversion of hypertriglyceridemic very-low-density lipoprotein to low-density lipoproteins.* J. Biol. Chem., 1984. 259, p. 14728-35.

Brown, MS.; Goldstein, JL. y Vanderberhe, K. *Prenatal diagnosis of homozygous familial hypercholesterolemia.* Lancet, 1978. 1, p. 526-8.

Campoy, C.; Bayes, R. y Molina, J. *Influencias del estrés intraparto en el metabolismo de los lípidos. Adaptación de los sistemas de transporte de lípidos plasmáticos en el recién nacido.* An. Esp. Pediatr., 1990. 33, p. 245-252.

Campoy, C.; Bayes, R. y Molina, J. *Estimación del grado de madurez metabolico-energética del recién nacido prematuro: perfil de lípidos del plasma y sistemas de transporte de lipidos.* An. Esp. Pediatr., 1990. 33, p. 237-244.

Carlson, LA.; Hardell, LJ. *Very low density lipoproteins in cord blood.* Clin. Chim. Acta, 1978. 90, p. 295.

Carson, DA.; Kay, J. y Seegmiller, JE. *Lymphospecific toxicity in adenosine-deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency and purine nucleoside kinase (s).* Proc. Natl. Acad. Sci., 1977. 74, p. 5677-5681.

Cheney, B.; Finch, CA. *Effect of inosine on iron absorption in rats.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960. 103, p. 37-38.

Chessex, P.; Reichman, B.; Verellen, G.; Putet, G.; Smith, JM.; Heim, T. y Swyer, PR. *Metabolic consequences of intrauterine growth retardation in very low birthweight infants.* Pediat Res., 1984. 18, p. 709-13.

Chessex, P. *Nutritional problems and catch-up growth in infants with intrauterine growth retardation.* En: Senterre, ed., Intrauterine growth retardation, Raven Press, New York, 1989. p. 281-295.

Christensen, NC. *Concentrations of triglycerides, free fatty acids and glycerol in cord blood of newborn infants with a birth weight less than 2700 grams.* Acta Paediatr. Scand., 1977. 66, p. 43-8.

Christensen, NC. *Lipids in cord serum and free fatty acids in plasma in healthy newborn term infants.* Acta Paediatr. Scand., 1974. 63, p. 711-5.

Christensen, N. *Free fatty acids, glycerol and triglycerides during the first 24 hours in infants with a birth weight less than 2700 grams.* Acta Paediatr. Scand., 1981. 70, p. 485-90.

Cisternas, JR.; Llanos, A.; Celedon, JM. y Riquelme, R. *Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity in normal full-term newborn infants.* Rev. Bras. de Pesquisas Med. e Biol., 1979. 12, p. 9-15.

Clandinin, MT.; Chappell, JE. *Long-chain polyenoic fatty acids in human milk: Are they of benefit to the new born?.* En: Schaub J.,

ed. Composition and physiological properties of human milk. Elsevier, Amsterdam, 1985. p. 213-224.

Clarke, WR.; Schrott, HG.; Leaverton, PE.; Connor, WE. y Lauer, RM. *Tracking of lipids and blood pressure in school-age children: The Muscatine study.* Circulation, 1978. 58, p. 626-34.

Coleman, JC.; Fink, CS.; Mehta, NR., et al. *Fat absorption and weight gain in preterm infants fed medium and long chain triglyceride formulas.* J. Am. Coll. Nutr., 1984. 3, p. 256.

Coleman, RA.; Haynes, EB.; Sand, TM. y Davis, RA. J. Lipid Res., 1988. 29, p. 33-42.

Cornwell, DG. y Kruger, FA. *Lipoprotein prestaining and ultracentrifugation analysis in a density gradient.* Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1961. 107, p. 296-9.

Crawford, MA.; Hassam, AG. y Williams, G. *Essential fatty acids and fetal brain growth.* Lancet., 1976. 73, p. 452-453.

Cress, HR.; Shaher, RM.; Laffin, R. y Karpowicz K. *Cord blood hyperlipoproteinemia and perinatal stres.* Pediatr. Res., 1977. 11, p. 19-23.

Cress, HR.; Shaher, RM.; Greenberg, MH. y Laffin, R. *Lipoproteins in neonates.* J. Pediatr., 1974. 84, p. 585.

Curnow, DH. y Crawford, IG. *The development of plasma lecithin: cholesterol acyltransferase in the perinatal rat.* Scand. J. Clin. Invest., 1972. 29, p. 3-12.

Curran, JS. *Sodium homeostasis in the newborn and low-birth-weight infant.* Semin. Perinatol., 1979. 3, p. 363-368.

Dancis, J.; Braverman, N. y Lind, J. *Plasma protein synthesis in the human fetus and placenta.* J. Clin. Invest., 1957. 44, p. 1-109.

Darmady, JM.; Fosbrooke, AS. y Lloyd, JK. *Prospective study of serum cholesterol levels during first year of life.* Br. Med. J., 1972., 11, p. 685-8.

Davies, DP.; Platts, P.; Pritchard, M. y Wilkingson, PW. *Nutritional status of light-for date infants at birth and its influence on early postnatal growth.* Arch Dis Child., 1979. 54, p. 703-6.

Davies, DP. *Growth of "small-for-dates" babies.* Early Hum Dev., 1981. 5, p. 95-105.

Davis, PA.; Forte, TM.; Nichols, AV. y Blum, CB. *Umbilical cord blood lipoproteins: isolation and characterization of high density lipoproteins.* Arteriosclerosis, 1983. 3, p. 357-65.

Davis, PA. y Forte, TM. *Neonatal umbilical cord blood lipoproteins. Isolation and characterization of intermediate density and low density lipoproteins.* Arteriosclerosis, 1982. 2, p. 37-43.

Davis, RA y Malone-McNea , M. Biochem. J., 1985. 227, p. 29-35.

De Leeuw, R.; Kok, K.; Devries, IJ. y Beganovic, N. *Tolerance of intravenously administered lipid in newbornw.* Acta Paediatr. Scand., 1985. 74, p. 52-56.

Decsi, T.; Molnar, D., Klujber, L. *Lipids levels in very low birthweight pretarm infants.* Acta Paediatr. Scand., 1990. 79, p. 577-80.

DeLamatre, JG. y Roheim, PS. Biochim. Biphys. Acta, 1983. 751, p. 210-7.

DeLuchi, C.; Pita ML; Faus, MJ; Molina JA.; Uauy, R. y Gil, A. *Effects of dietary nucleotidos on the fatty acid composition of erytrocyte membrane lipids in term infants.* J. Ped. Gastro. and Nutr., 1987. 6, p. 568-574.

Desai, ID.; Martinez, FE.; Dos Santos, JE. y Dutra de Oliveria, JE. *Transient lipoprotein deficiency at birth: a cause of low*

levels of vitamin E in the newborn. Acta Vitaminol. Enzymol., 1984. 6, p. 71-6.

Díaz, M.; Ramon y Cajal, J.; Jimenez, MD.; Martinez, H.; Pocovi, M. y Grande, F. *Cord blood lipoprotein-cholesterol: relationship birth weight and gestational age of newborns.* Metabolism, 1989. 38, p. 435-8.

Diczfalusy, E. *Endocrine functions of the human fetus and placenta.* Am. J. Obstet. Gynecol., 1974. 119, p. 419.

Dnanireddy, R.; Hamosh, M.; Sivesubramanian, KN.; Chowdhry, P.; Scanlon, JW. y Hamosh, P. *Postheparin lipolytic activity and intralipid clearance in very-low-birth-weight infants.* J. Pediatr., 1981. 98, p. 617.

Dobiasova, M.; Stozicky, F.; Kopecka, J. *Lecithin:cholesterol acyltransferase activity in children in the early neonatal period.* Biol. Neonate, 1984. 45, p. 165-8.

Dubowitz, IM.; Dubowitz, V. y Galdherg, C. *Clinical assessment of gestacional age in the newborn infant.* J. Pediat., 1979. 77, p. 1.

Durschlag, RP. y Robinson, JL. *Species specificity in the metabolic consequences of orotic acid consumption.* J. Nutr., 1980. 110, p. 816.

Durschlag, RP. y Robinson, JL. *Orotic acid induced metablic changes in the rat.* J. Nutr., 1980. 110, p. 816-821.

Eisenberg, S. *High density lipoprotein metabolism.* J. Lipid Res., 1984. 25, p. 1017-1058.

Eisenberg, S.; Bilheimer, DW., Levy, RI. y Lindgren, FT. *On the metabolic conversion of human plasma very low density lipoprotein to low density lipoprotein.* Biochem. Biophys. Acta, 1973. 326, p. 361-77.

Elshourbagy, NA., Boguski, MS.; Liao, WS.; Jefferson, LS.; Gordon, JI. y Taylor, JM. *Expression of rat apolipoprotein A-IV and A-I genes: mRNA induction during development and in response to glucocorticoids and insulin.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1985. 82, p. 8242-6.

Faelli, A.; Espósito, G. *Effect of inosine and its metabolites on intestinal iron absorption in the rat.* Biochem. Pharmacol., 1970. 19, p. 2551-2554.

Faergeman, O.; Sata, T.; Kane, JP. y Havel, RJ. *Metabolism of apolipoprotein B of very low density lipoproteins in the rat.* J. Clin. Invest., 1975. 56, p. 1396-1403.

Farris, RP.; Frank, GC.; Webber, LS.; Srinivasan, SR. y Berenson, GS. *Influence of milk source on serum lipids and lipoproteins during the first year of life, Bogalusa Heart Study.* Am. J. Clin. Nutr., 1982. 35, p. 42-9.

Faus, MJ.; Gil, A.; Robles, R.; Sánchez-Pozo, A.; Pita, ML.; Sánchez-Medina, F. *Changes in serum aaalbumin, transferrin and amino acid indices during the first month of life in small-for-date infants.* Ann Nutr Metab., 1984. 28, p. 70-6.

Farr, V.; Nelogan, GA., y Parquing, IM. *The definition of some external characteristics used in the newborn infant.* Developed. Med. Clin. Nerol., 1966. 8, p. 657.

Fawcett, JK.; Scott, JE. *A rapid and precise method for the determination of urea.* Clin. Pathol., 1960. 13, p. 156-9.

Fernando-Warnakulasuriya, GJP.; Eckerson, ML.; Clark, WA. y Wells, MA. *Lipoprotein metabolism in the suckling rat: characterization of plasma and lymphatic lipoproteins.* J. Lipid Res., 1983. 24, p. 1626-38.

Fitzhardinge, PM. y Steven, EM. *The small-for-date infant.* I. Later growth patterns. Pediatrics, 1972. 49, p. 671-81.

Fomon, SJ.; Rogers, RR.; Ziegler, ER.; Nelson, SE. y Thomas, IN. *Indices of fatness and serum cholesterol at age 8 years in*

relation to feeding and growth during early infancy. Pediatr. Res., 1984. 18, p. 233-38.

Fomon, SJ.; Ziegler, EE. y Vasquez, HD. *Human milk and the small premature infant.* Am. J. Dis. Child., 1977. 131, p. 463-467.

Fordyce, MK.; Duncan, R.; Chao, R.; Christakis, M.; Hsia, SL.; Robertson, E.; Kafatos, A. y Christakis, G. *Cord blood serum in newborn of diabetic mothers.* J. Chronic. Dis., 1983. 36, p. 263-8.

Forte, TM.; Davis, PA.; Nordhausen, RW. y Glueck, CJ. *The electron microscopic structure of human umbilical cord blood lipoproteins.* Artery, 1982. 10, p. 223-36.

Fosbrooke, AS. y Wharton, BA. *Plasma lipids in umbilical cord blood from infants of normal and low birth weight.* Biol. Neonate, 1973. 23, p. 330-8.

Frederick, B.; Rudolph, FB.; Fanslow, WC.; Anil, D.; Kulkarni, AD. y Van Buren, CT. *Effect of dietary nucleotides on lymphocyte maturation.* Ped., Res., 1985. 19, p. 773.

Fredrickson, DS. y Breslow, JL. *Primary hyperlipoproteinemia in infants.* Ann. Rev. Med., 1973. 24, p. 315-24.

Freedman, DS.; Sher, CL.; Srinivasan, SR.; Webber, LS. y Berenson, GS. *Tracking of serum lipids and lipoproteins in children over an 8-year period: The Bogalusa heart study.* Prev. Med., 1985. 14, p. 203-16.

Friedman, G. y Goldberg, SJ. *Concurrent and subsequent serum cholesterol in breast and formula-fed infants.* Am. J. Clin. Nutr., 1974. 28, p. 42-5.

Frost, SC.; Clark, WA. y Wells, MA. *Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. IV. In vivo rates of triacylglycerol secretion by intestine and liver.* J. Lipid Res., 1983. 24, p. 899-903.

García Molina, V.; Aguilera, JA.; Gil, A. y Sánchez Pozo, A. *Acid. soluble nucleotide composition in suckling rat liver.* J. of Feto-Maternal Med., 1989. 2, p. 49-54.

Genzel-Boroviczeny, O.; Forte, TM. y Austin, MA. *High-density subclass distribution and human cord blood lipid levels.* Pediatr. Res., 1986. 20, p. 487-91.

Genzel-Boroviczeny, O.; D'Harlingue, AE., Kao, LC.; Scott, C. y Forte, TM. *High-density lipoprotein subclass distribution in premature newborns before and after the onset of enteral feeding.* Pediatr. Res., 1988. 23, p. 543-7.

Georgieff, MK.; Sasanow, SR.; Mammel, MC. y Pereira, GR. *Mid-arm circumference/head circumference ratios for identification of symtomatic LGA, AGA, an SGA newborn infants.* J Pediatr., 1986. 109, p. 316-21.

Gidez, LI.; Roheim, PS. y Eder, HA. *Effect of diet on the cholesterol ester composition of liver and of plasma lipoproteins in rat.* J. Lipid Res., 1965. 6, p. 377-82.

Gibbons, GF. *Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotin.* Biochem. J., 1990. 268, p. 1-13.

Giblett, ER.; Ammann, AJ.; Wara, DW.; Sandman, R. y Diamomond, LK. *Nucleoside phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity.* Lancet., 1975. 1, p. 1010-1013.

Giblett, ER.; Anderson, JE.; Cohen, F.; Pollara B. y Meuwissen, HJ. *Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severly impaired cellular immunity.* Lancet., 1972. 2, p. 1067-1073.

Gil, A. *Factores de crecimiento y desarrollo de la leche humana.* En: Avances en la nutrición de la infancia, vol. 3, 1989.

Gil, A. *Human milk nucleotides: Influences on the lipid metabolism of newborn infants.* In: Symposium S82. Human milk

recent knowledge. XVII International Congress of Pediatrics. 1983; Manila.

Gil, A. *Nucleótidos en la lecha humana. Fundamento para su empleo en leches infantiles.* Granada: Europa de Dietéticos y Alimentación, S.A. 1984; EDDA.

Gil, A.; Corral, E.; Martínez, A. y Molina, JA. *Effects of dietary nucleotides on the microbial pattern of feces of at term newborn infants.* J. Clin. Nutr. Gastr., 1986. 1, p. 34-38.

Gil, A.; Lozano, E.; DeLucchi, C.; Maldonado, J.; Molina JA. y Pita, ML. *Changes in the fatty acid profiles of plasma lipid fractions induced by dietary nucleotides in infants born a term.* Eur. J. Clin. Nutr., 1988. 42, p. 473-481.

Gil, A.; Pita, ML.; Martínez, A.; Molina, JA. y Sánchez-Medina, F. *Effect of dietary nucleotides on the plasma fatty acids in at term neonates.* Hum. Nutr. Clin. Nutr., 1986. 40c, p. 185-95.

Gil, A. y Sánchez-Medina, F. *Acid soluble nucleotides of human milk at different stages of lactation.* J. Dairy Res., 1982. 49, p. 301.

Ginsberg, HN.; Le, NA.; Mellish, J.; Steinberg, D. y Brown, WV. *Effect of a high carbohydrate diet on apolipoprotein B catabolism.* Metabolism, 1981. 30, p. 347-104.

Ginsburg, BE. y Zetterström, R. *High density lipoproteins concentrations in newborn infants.* Acta Paediatr. Scand., 1977. 66, p. 39-41.

Ginsburg, BE. y Zetterström, R. *Serum cholesterol concentration in early infancy.* Acta Paediatr. Scand., 1980. 69, p. 581-5.

Ginsburg, BE. y Zetterström, R. *Serum cholesterol concentration in newborn infant with gestational ages 28-42 weeks.* Acta Paediatr. Scand., 1980. 69, p. 587-92.

Glomset, JA. *The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction.* J. Lipid Res., 1968. 9, p. 155-67.

Glueck, CJ.; Heckman, F. y Schoenfeld, M. *Neonatal familial type II hyperlipoproteinemia: Cord blood cholesterol in 1800 births.* Metabolism, 1971. 20, p. 597-608.

Glueck, CJ. y Tsang, M. *Potential relationships to the development of atheroscleorisi.* En: Winyck M. Ed. Human Nutrition, pre-and postnatal development. Plennun Press. New York, 1979. p. 363-70.

Glueck, CJ.; Tsang, WB. y Fallat, R. *Plasma and dietary cholesterol in infancy: effects of early low or moderate dietary cholesterol intake on subsequent response to increased dietary cholesterol.* Metabolism, 1972. 21, p. 1181-92.

Goodman, DS. y Shiratori T. *In vivo turnover of different cholesteryl esters in rat liver and plasma.* J. Lipd. Res., 1964. 5, p. 578-86.

Gordon, JI.; Smith, DP.; Alpers, DH. y Straus, AW. J. Lipid Res., 1982. 22, p. 5424-31.

Gordon, HH.; Levine, SZ. y McNamara, H. *Feeding of premature infants: Comparison of human and cow's milk.* Am. J. Dis. Child., 1947. 73, p. 442

Gouedard, H.; Leglise, D. y L'Hostis, D. y Conan, G. *Evolution of serum cholesterol and cholesterol lipoprotein fraction levels in the neonatal period.* Arch. Fr. Pediatr., 1982. 39, p. 437-40.

Gruenwald, P. *Growth of the human fetus. I. Normal growth and its violation.* AM. J. Obstet. Gynecol., 1966. p. 94-1112. *II. Abnormal growth in twins and infants of mothers with diabetes, hypertension, or isoinmunization.* Am. J. Obstet. Gynecol., 1966. p. 94-1120.

Gustavson, A.; Kjellmer, J.; Olegard, R. y Victorin, L. *Nutrition in low-birth weight infants. I. Intravenous injection of fat emulsion.* Acta Paediatr. Scand., 1972. 61, p. 149-58.

Gyllenberg, H.; Carlberg, C. *The nutritional characteristics of the bifid bacteria (Lactobacillus bifidus) on infants.* Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1958. 44, p. 287-292.

Gyorgy, P. *Biochemical aspects of human milk.* Am. J. Clin. Nutr., 1971. 24, p. 970.

Gyorgy, P.; Kihn, R. y Rose, CS. *Bifidus factor II. Its ocurrence in milk from different species and in other natural products.* Arch. Biochem. Biophys., 1954. 48, p. 202-208.

Gyorgy, P.; Norris, RF. y Rose, CS. *Bifidus factor I: A variant of latobacillus bifidus requiring a special growth factor.* Arch. Biochem. Biophys., 1954. 48, p. 193-201.

Hahn, P. *Lipid metabolism and nutrition in the prenatal and postnatal period.* Curr. Concepts Nutr., 1972. 1, p. 99.

Hamilton, RL.; Guo, LSS.; Felker, TE.; Chao, Y. y Havel, RJ. *Nascent high density lipoproteins from liver perfusates of orotic acid-fed rats.* J. Lipid Res., 1986. 27, p. 967-78.

Hammer, OJ.; Houlsby, WT.; Thom, H.; Ross, IS.; Lloyd, DJ. y Russel, G. *Fat as an energy supplement for preterm infants.* Am. Dis. Child., 1982. 57, p. 503-6.

Hamosh, M.; Simon, MR.; Canter, H. y Hamosh, P. *Lipoprotein lipase activity and blood triglyperide levels in fetal and newborn rats.* Pediatr. Res., 1978. 12, p. 1132-6.

Hamosh, M. *The development of the metabolic and transport function of the gastrointestinal system.* En: Jones CT, ed. Biochemical development of the fetus and neonate. Elsevier. Nueva York, 1982. p. 591-619.

Hardell, LI. *Serum lipids and lipoproteins at birth based on a study of 2815 newborns infants.* Acta Paediatr. Scand., 1981. 70, p. 5-29.

Harkness, RA.; Darling, JAB.; Bain, AL. y Syme, J. *Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency in a child with terminal pulmonary hyaline membrane disease.* Arch. Dis. Childh., 1973. 48, p. 906-10.

Harms, VH. y Stirling, CE. *Transport of purine nucleosides and nucleotides by in vitro rabbit ileum.* Am. J. Physiol., 1977. 233, p. E47-55.

Harris, RJ. *Plasma nonesterified fatty acid and blood glucose levels in healthy and hypoxemic newborn infants.* J. Pediatr. 1974. 84, p. 578-84.

Havel, RJ.; Shore, VG.; Shore, B. y Bier, DM. *Role of specific glycopeptides of human serum lipoproteins in the activation of lipoprotein lipase.* Circ. Res., 1970. 47, p. 595.

Havel, RJ.; Kane, JP. y Kashyap, ML. *Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man.* J. Clin. Invest., 1973. 52, p. 32-8.

Hay, WW. *Fetal and neonatal glucose homeostasis and their relation to the small-for-gestational age infant.* Semin Perinatol., 1984. 8, p. 101-16.

Haymond, MW.; Karl, I. y Pagliara, AS. *Increased gluconeogenesis substrates in the small-for-gestational age infant.* N. Engl. J. Med., 1974. 291, p. 322-8.

Henry, PJ.; Sobel, S. y Kim, J. Am. J. Clin. Path., 1957; 28, p. 158.

Hill, RM.; Verniaud, WM.; Deter, RL. et al. *The effect of intrauterine malnutrition on the term infant.* Acta Paediatr. Sacand., 1984. 73, p. 482-7.

Högstedt, B. y Lindquist, B. *Lipoprotein lipase in plasma of the normal newborn infant.* Acta Paediatr. Scand., 1963. 52, p. 61.

Holliday, MA. *Metabolic rate and organ size during growth from infancy to maturity and during late gestation and early infancy.* Pediatrics, 1971. 47, p. 169-79.

Hotzapple, PG.; Smith, G. y Koldosky, O. Pediatr. Res., 1975. 9, p. 786-791.

Howells, DW.; Levin, GE.; Brown, IRF. y Brooke, Og. *Plasma retinol and retinol-binding protein in pre-term infants born small-for-gestational-age or appropriate-weight-for-age.* Human Nutrition, 1983. 38C, p. 107-11.

Hudson, DG.; Helphick, MC. y Hull, D. Biol. Neonate, 1976. 32, p. 290-295.

Hull, D. *The function and development of adipose tissue.* En: Davis J; Debbing J eds. Scientific Foundations of Pediatrics. Saunders Co. Philadelphia, 1974. p. 440.

Humbert, JR.; Abelson, H.; Hathaway, WE. y Battaglia, F. *Polycythemia in small-for-gestational-age infants.* J. Pediatr., 1969. 75, p. 812-9.

Huttunen, JK.; Saarinen, UM.; Kostianen, E. y Siimes, MA. *Fat composition of infant diet does not influence subsequent serum lipid levels in man.* Atherosclerosis, 1983. 46, p. 87-94.

Imaizumi, K.; Lu YF. y Sugano, M. Biochim. Biophys. Acta, 1985. 837, p. 345-8.

Imaizumi, K.; Lu, YF. y Sugano, M. *Characterization of serum apolipoprotein patterns in rats during suckling and post-weaning periods.* Biochi. Biophys. Acta, 1987. 917, p. 269-78.

Innerarity, TL.; Bersot, TP.; Arnold, KS.; Weisgraber, KH.; Davis, PA.; Forte, TM. y Mahley, RW. *Receptor binding activity of high density lipoproteins containing apoprotein E from abetalipoproteinemic and normal neonate plasma.* Metabolism, 1984. 33, p. 186-95.

Jain, SK. *Prematurity and lecithin-cholesterol-acyltransferase deficiency in newborn infants.* Pediatr. Res., 1985. 19, p. 58-60.

Janas, IM.; Picciano, MF. *The nucleotide profile of human milk.* Ped. Res., 1982. 16, p. 659-62.

Jarvenpaa, AL. *Feeding the low-birth-weight infant IV. Fat absorption as a function of diet and duodenal bile acids.* Pediatrics, 1983. 72, p. 684.

Joes, ME. *Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals.* Ann. Rev. Biochem., 1980. 49, p. 253-279.

Johanson, MBN. *Lipoproteins and lipids in fetal, neonatal and adult rats.* Biol. Neonate, 1983. 44, p. 278-86.

Johansson, MBN. y Karlsson, BW. *Lipoprotein and lipid profiles in serum of the fetal, neonatal and adult pig.* Biol. Neonate, 1982. 42, p. 127-37.

Johnson, HJ.; Simpson, ER. y Carr, BR. *The levels of plasma cholesterol in the human fetus throughout gestation.* Pediatr. Res., 1982. 16, p. 682-3.

Jones, JB.; Mehta, NR. y Hamosh, M. *Alfa-amylase in preterm human milk.* J. Pediatr Gastroenterol Nutr., 1982. 1, p. 43-48.

Khamsi, F.; Merkatz I. y Solomon S. *The conversion of acetate to cholesterol in the fetus of the baboon and transfer of cholesterol from mother to fetus.* Endocrinology, 1972. 91, p. 6.

Kirstein, P. y Carlsson, IA. *Determination of the cholesterol content of high density lipoproteins subfracctions HDL_2 and HDL_3 without contamination of Lp (a) in human plasma.* Clin. Chem. Acta, 1981. 113, p. 123-5.

Kirstein, D.; Johansen, KB.; Petersen, MBV. y Andersen, GE. *Changes in plasma lipoproteins from first to third week of life in healthy breast-fed infants.* Acta Paediatr. Scand., 1985. 74, p. 733-7.

Klimov, AN.; Nikiforova, AA.; Chistyakova, AM.; Magracheva, EY. y Anderson, DW. *Lecithin:cholesterol-acyltransferase deficiency in the blood plasma of newborn.* Artery, 1978. 4, p. 9-27.

Knoop, RH.; Lawson, R. y Li, JR. *Effect of high density lipoprotein on progesteron secretion by cultured placental cells.* Circulation, 1981. 64, p. 271.

Krause, BR.; Sloop, CH.; Castle, CK. y Roheim, PS. J. Lipid Res., 1981. 22, p. 610-9.

Krieger, I.; Whitten, CF. *Energy metabolism in infants with growth failure due to maternal deprivation, undernutrition, or causes unknown.* Pediatrics, 1969. 75, p. 374-79.

Kobata, A. *Nutritional study of nucleotide components in the milk.* Acta Paed. Jap., 1969. 73, p. 197-209.

Kupke, IR. y Wörz-Zeugner, S. *Sequential microultracentrifugation of lipoproteins in 100 µl of serum.* Journal of Lipid Research, 1986. p. 988-95.

Kulkarni, AD.; Fanslow, EC.; Drath, DB.; Rudolph, FB. y Van Buren, CT. *Influence of dietary nucleotide restriction on bacterial sepsis and phagocytic cell function in mice.* Arc. Surg., 1986. 21, p. 169-172.

Kulkarni, AD.; Fanslow, EC.; Rudolph, FB.; y Van Buren, CT. *Effect of dietary nucleotides on rsponse to bacterial infection.* JPEN., 1986. 10, p. 169-171.

Kulkarni, AD.; Schandle, VB.; Rudolph, FB. y Van Buren, CT. *Suppression of delayed-type Hypersensitivity (DTH) to SRBC mice fed nucleotide-free diet.* Fed. Proc., 1982. 41, p. 589.

Kulkarni, SC.; Bhatheley, DC.; Zander, AR.; Van Buren, CT. Rudolph, FB.; Kulkarni, AD. y Dicke, KA. *T-cell impairment in mouse radiation chimeras by nucleotide-free diet (NFD).* Exp. Hematol., 1984. 12, 694-699.

Lacko, AG.; Rutenberg, HL. y Soloff, IA. *Serum cholesterol esterification in species resistant and susceptible to atherosclerosis.* Atherosclerosis, 1974. 19, p. 297-305.

Lacko, AG.; Rutenberg, HL. y Soloff, IA. *On the rate of cholesterol esterification in cord blood serum.* Lipids., 1972. 7, p. 426-9.

Lane, DM. y McConathy, WJ. *Factors affecting the lipid and apolipoprotein levels of cord sera.* Pediatr. Res., 1983. 17, p. 83-91.

Lane, DM. y McConathy, WJ. *Changes in the serum lipids and apolipoproteins in the first four weeks of life.* Pediatric Res., 1986. 20, p. 332-7.

Laskarzewski, P.; Morrison, JA.; deGroof, I.; et al. *Lipid and lipoprotein tracking in 108 children over a four-year period.* Pediatrics, 1979. 64, p. 584-91.

Lastra, G.; Garcia del Rio, M.; Jurado, A.; Martinez, A. *Apoproteinas A y B en recien nacidos de bajo peso. Relación con el colesterol y los triglicéridos.* Premios Nutrición Infantil 1986. Ed. Sociedad Nestlé. Barcelona.

Lebenthal, E.; Nitzan, M.; Lee, PC.; Chrzanowski, BL. y Krasner, J. *Small intestinal enzymes during normal development and the effect of intrauterine growth retardation in fetal rats.* Biol. Neonate., 1981. 39, p. 14-21.

Lebenthal, E.; Nitzan, M.; Chrzanowski, BL.; Krantz, B. *The effect of reduced materno-fetal blood flow on the development of fetal pancreatic acinar cells and zymogens.* Pediat. Res., 1980. 14, p. 1356-9.

Lebenthal, E.; Nitzan, M.; Lee, PC.; Chrzanowski, BL. y Krasner, J. *Effect of intrauterine growth retardation on the activities of fetal intestinal enzymes in rats.* Biol. Neonate., 1981. 39, p. 14-21.

Leblanc, MH.; D'Cruz, C. y Pate, K. *Necrotizing enterocolitis can be caused by polycythemic hyperviscosity in the newborn dog.* J. Pediatr., 1984. 105, p. 804-9.

Lee, DM.; Koren, E.; Sing, E. y Mok, T. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1984. 123, p. 1149-56.

Leleiko, NS.; Bronstein, AD.; Baliga, S. y Munro, HN. *De novo purine nucleotide synthesis in the rat small and large intestine: Effect of dietary protein and purines.* J. Ped. Gastr. Nutr., 1983. 2, p. 313-9.

Leleiko, NS.; Bronstein, AD. y Munro, HN. *Effect of dietary purines on the novo synthesis of purine nucleotides in the small intestinal mucosa.* Ped. Res., 1979. 13, p. 403.

Liao, TH.; Buczeck, RJ.; Mehta, NR.; Grylack, LJ.; et al. *Fat digestion in the preterm infant: Hydrolysis of medium and long chain formula triglyceride in the stomach.* Pediatr. Res., 1983. 17, p. 194A.

Lin, DS.; Pitkin, RM. y Connor, WE. *Placental transfer of cholesterol into the human fetus.* Am. J. Obstet. Gynecol., 1977. 128, p. 735-9.

Llobera, M.; Montes, A.; Herrera, E. *Lipoprotein-lipase activity in liver of the rat fetus.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 1979. 91, p. 272-7.

Lowry, OH.; Rosebrough, NJ.; Farr, AL. y Randall, RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J. Biol. Chem., 1951. 193, p. 265-75.

Lubchenko, LO. y Bard, H. *Incidence of hypoglycemia in newborn innfants classified by birthweight and gestational age.* Pediatrics, 1971. 47, p. 831-8.

MacLean, WC. y Fink, BB. *Lactose malabsorption by premature infants: magnitude and clinical significance.* J. Pediatr., 1980. 97, p. 383-8.

Maguire, G.; Lee, M. y Connelly, PW. *Sodium dodecyl sulfate-glycerol polyacrylamide gel slab electrophoresis for the resolution of apolipoproteins.* J. Lipid Res., 1989. 30, p. 757-61.

Mallow, MJ.; Kane, JP.; Hardman, DA.; Hamilton, RL. y Dalal, KB. *Normotriglyceridemic abetalipoproteinemia.* J. Clin. Invest., 1981. 67, p. 1441-50.

Martinsen, K.; Ehnholm, C.; Huttunen, JK.; Tervila, L. y Kostiainen, E. *Intrapartum stress lowers the concentration of high density lipoprotein cholesterol in cord plasma.* Eur. J. Clin. Invest., 1981. 11, p. 351-4.

Mazur, A.; Green, S.; Saha, A. y Caleton, A. *Mechanism of release of ferritin iron in vivo by xanthine oxidase.* J. Clin. Invest., 1958. 37, p. 37-38.

McConathy, WJ. y Lane, DM. *Studies on the apolipoprotein and lipoproteins of cord serum.* Pediatr. Res., 1980. 14, p. 757-61.

McHill, HC.; Geer, JC. y Strong, JP. *Natural history of human atherosclerotic lesions.* En: Sandller M. Bourne M eds. New York, Academic Press, 1963.

McMillan, JA.; Oski, A.; Lourie, G.; Tomarelli, RM. y Landaw, SA. *Iron absorption from human milk, simulated human milk and propietary formulas.* Pediatrics, 1977. 60, p. 896.

Mehes, K. y Adamovich, K. *Effect of quality of feeding on serum lipoprotein levels in premature infants.* Acta Paediatr. Hung., 1988. 29, p. 245-8.

Melichar, V. Novak, M.; Hahn, P.; Koldosky, O. y Zeman L. *Changes in the blood levels of lipid metabolites and glucose following a fatty meal in infants.* Acta Paediatr., 1962. 51, p. 481-9.

Melichar, V. y Wolf, H. *Postnatal changes in the blood serum content of glycerol and free fatty acids in premature infants.* Biol. Neonate, 1967. 11, p. 50-60.

Melichar, V. y Wolf, H. *Glycerol and free fatty acids in plasma of hypertrophic newborns.* Klin. Wochenschr., 1968. 46, p. 549-55.

Mellies, MJ.; Laskarzewski, P.; Tracy, T. y Glueck, CJ. *Tracking of high and low-density lipoproteins cholesterol from childhood to young adulthood in a single large kindred with familial hypercholesterolemia.* Metabolism, 1985. 34, p. 747-53.

Miettinen, TA.; Proia, A. y McNamara, DJ. *Origins of fecal neutral steroids in rats.* J. Lipid Res., 1981. 22, p. 485-95.

Mettau, JW.; Degenhart, HJ.; Visser, HKA. y Holland, WPS. *Measurement of total body fat in newborns and infants by*

absorption of nonradioactive xenon. Pediat. Res., 1977. 11, p. 1097-101.

Miller, HC. y Hassanein, K. *Diagnosis of impaired fetal growth in newborn infants.* Pediatrics, 1971. 48; 511-22.

Mills, GL. y Taylaur, CE. *The distribution and composition of serum lipoprotein in eigteen animals.* Comp. Biochem. Physiol., 1971. 40B, p. 489.

Mott, GE.; Jackson, EM.; McMahan, CA.; Farley, CM. y McGill, HC. *Cholesterol metabolism in juvenile baboons. Influence of infant and juvenile diets.* Arteriosclerosis, 1985. 5, p. 347-54.

Nayai, H.; Usui, T.; Akaishi, K. y Ioi, S. *The effect of supplementation of nucleotides to commercial milk on the weight gain of premature and healthy infants.* Ann. Paediatr. (Jan), 1963. 9, p. 169-175.

Newman, WP.; Freedman, DS.; Voors, AW.; et al. *Relation of serum lipoprotein levels and systolic blood pressure to early atherosclerosis.* N. Engl. J. Med., 1986. 314, p. 138-44.

Nichols, BL. y Nichols, VN. *Nutrition during early development.* En: Linder ed., Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications, Elsevier. New York, 1985. p. 285-283.

Nilsson-Ehle, P. *Regulation of lipoprotein lipase.* En: Carlson A, Pernow B Eds. Metabolic risk factors in Ischemic Cardiovascular Diseases. Raven Press, New York, 1982. p. 49-57.

Norris, RF.; Flanders, T.; Tomarelli, RM. y Gyorgy P. *The isolation and cultivation of lactobacillus bifidus: a comparison of branched and umbranched strains.* J. Bacteriol., 1950. 60, p. 681-696.

Núñez, MC.; Aydarte, MV.; Morales, D. y Gil, A. *Cambio en las actividades de disacáridas intestinales por suplementación de nucleótidos en la dieta.* III Congreso Luso Español de Bioquímica. Santiago de Compostela, 13-9, 1988.

Ogoshi, S.; Iwata, M.; Kitagawa, S.; et al. *Effect of total parenteral nutrition with nucleoside and nucleotide mixture on D-galactosamine-induced liver injury in rats.* JPEN, 1988. 12, p. 53-57.

Orchard, TJ.; Donahue, RP.; Kuller, LH.; Hodge, PN. y Drash, AL. *Cholesterol screening in childhood: Does it predict adult hypercholesterolemia?. The Beaver County experience.* J. Pediatr., 1983. 103, p. 687-91.

Oschry, Y. y Eisenberg, S. *Rat plasma lipoproteins: re-evaluation of a lipoprotein system in a animal devoid of cholesteryl ester transfer activity.* J. Lipid Res., 1982. 23, p. 1099-1106.

Ounsted, M.; Moar, V. y Scott, A. *Growth in the fist four years: II. Diversity within groups of small-for-dates and large-for-dates bavies.* Early Hum. Dev., 1982. 7, p. 29-39.

Ounsted, M. y Sleigh, G. *The infant's self-regulation of food intake and weight gain.* Lancet., 1975. 1, p. 1393-7.

Papadopoulos, A.; Hamosh, M.; Chowdhry, P.; Scanlon, JW. y Hamosh, P. *Lecithin-cholesterol acyltransferase in newborn infants: low activity level in preterm infants.* Clin. Lab. Obs., 1988. 113, p. 896-898.

Parker, CR.; Simpson, ER.; Bilheimer, DW.; Leveno, K.; Carr, BR. y MacDonald, PC. *Inverse relation between low-density lipoprotein-cholesterol and dehydroisoandrosterone sulfate in human fetal plasma.* Science, 1980. 208, p. 512-4.

Parker, CR.; Fortunato, SJ.; Carr, BR.; Owen, J.; Hankins, GD. y Hauth, JC. *Apolipoprotein A-1 in umbilical cord blood of newborn infants: relation to gestational age and high-density lipoprotein cholesterol.* Pediatr. Res., 1988. 23, p. 348-51.

Parker, CR.; Carr, BR.; Simpson, ER. y McDonald, PC. *Decline in the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in human fetal plasma near term.* Metabolism, 1983. 32, p. 919-23.

Parwaresch, MR. y Radzum, HJ. *Lack of very low density lipoproteins in cord blood.* Clin. Chim. Acta, 1978. 83, p. 295.

Patsch, JR.; Gotto, AM.; Olivercrona, T. y Eisenberg, S. *Function of high density lipoprotein-like particles during lypolysis of very low density lipoprotein in vitro.* Procc. Natl. Acad. Sci. USA., 1978. 75, p. 4519-23.

Patsch, W.; Wiztum, JL. y Ostlund, R. *Structure, immunology, and cell reactivity of low density lipoproteins from umbilical vein of a newborn type II homozygote.* J. Clin. Invest., 1980. 66, p. 123-9.

Pegorier, JP.; Leturque, A.; Ferre, P.; Turlan, P. y Girard, J. *Effects of medium-chain triglyceride-feeding on glucose homeostasis in the newborn rat.* Am. J. Physiol., 1983. 244, p. E329-34.

Pencharz, PB.; Masson, M.; Desgranges, F. y Papageorgiou A. *Total-body protein turnover in human premature neonates: effects of birthweight, intrauterine nutritional status, and diet.* Clin. Sci., 1981. 61, p. 207-15.

Persson, B. y Tunell, R. *Influence of environmental temperature and acidosis on lipid mobilization in the human infant during the first two hours after birth.* Acta Paediatr. Scand., 1971. 60, p. 385-98.

Piccou, D. y Phillips, M. *Urea metabolism in malnourished children receiving a high or low protein diet.* Am. J. Clin. Nutr., 1972. 25, p. 1261.

Picou, D. y Taylor-Roberts, T. *The measurements of total protein synthesis and catabolism and nitrogen turnover in infants in different nutritional status and receiving different amounts of dietary protein.* Clin. Sci., 1969. 36, p. 283-96.

Pita, ML.; Sánchez-Pozo, A.; Gil, A.; Robles, R.; Faus, MJ. y Sánchez-Medina, F. *Perfil lipídico en recién nacidos de bajo peso, pequeños para la edad gestacional.* An. Esp. Pediatr., 1984. 3, p. 215-21.

Pita, ML.; Fernández, MR.; DeLucchi, C.; Medina, A.; Martínez-Valverde, A.; Uauy, R. y Gil, A. *Changes in fatty acids pattern of red blood cell phospholipids induced by type of milk, dietary nucleotides supplementation and postnatal age in preterm infants.* J. Ped. Gastr. Nutr., 1988. 7, p. 740-747.

Pocovi, M.; Ordovas, JM. y Grande, F. *Lecithin: cholesterol-acyltransferase, lipids and lipoproteins in maternal and umbilical cord plasma.* Artery, 1983. 11, p. 264-72.

Pottinger, LA. y Getz, GS. *Serum lipoprotein accumulation in the livers of orotic acid fed rats.* J. Lipid. Res., 1971. 12, p. 450-458.

Pribylova, H. y Rylander, L. *Free fatty acids, glycerol, glucose and hydroxybutirate of plasma of infants protected from cooling and exposed to cold at various times.* Biol. Neonate, 1972. 20, p. 425-35.

Putnam, JC.; Carlson, SE.; De Voe, PW y Barnes, LA. *The effect of variations in dietary fatty acid composition of erythocyte phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in human infants.* Am. J. Clin. Nutr., 1982. 36, p. 106-114.

Quarfordt, SH.; Hilderman, H.; Greenfield, MR. y Shelburne, FA. *The effect of human arginine rich apoprotein on rat adipose lipoprotein lipase.* Biophys. Res. Comm., 1977, 78, p. 302.

Rafstedt, S. *Studies on serum lipids and lipoproteins in infancy and chilhood.* Acta Paediatr. Scand. (Suppl), 1955. 102, p. 5-109.

Rassin, DK.; Sturmann, JA. y Gaull, GE. *Tauine and other free amino acids in milk of man and other mammals.* Eary Human Dev., 1978. 2, p. 1-13.

Reiser, R. y Sidelman, J. *Control of cholesterol homeostasis by cholesterol in the milk of the suckling rat.* J. Nutr., 1972. 102, p. 1009-16.

Robertson, AF. y Sprecher, H. *A review of human placental lipid metabolism and transport.* Acta Paediatr. (Uppsala) (Suppl 183), 1968.

Robinson, JL.; Dombrowski, DB.; Tauss, LR. y Jones, LR. *Assessment in humans of hipolipidemia induced by orotic acid.* Am. J. Clin. Nutr., 1985. 41, p. 605-08.

Robinson, JS.; Falconer, J. y Owens, JA. *Intrauterine growth retardation: clinical and experimental.* Acta Paediatr. Scand., 1985. Suppl 319, p. 135-42.

Robinson, JL.; Dombrowski, DB.; Tauss, LR. y Jones, LR. *Assessment in humans of hipolipidemia induced by orotic acid.* Am. J. Clin. Nutr., 1985. 41, p. 605-08.

Rosseneu, M.; Van Biervliet, JP.; Bury, J. y Vinamoint, N. *Isolation and characterization of lipoprotein profiles in*

newborns by density gradient ultracentrifugation. Pediatr. Res., 1983. 17, p. 788-94.

Roux, JM. *Nucleotide supply of the developing animal: Role of the so-called "salvage pathways".* Enzyme, 1973. 15, p. 361-77.

Rovamo, L.; Taskinen, MR.; Kuusi, T.; Nikkila, EA.; Ehnholm, C. y Raivio, KO. *Postheparin plasma lipase activities and plasma lipoproteins in newborn infants.* Pediatr. Res., 1984. 18, p. 642-7.

Rovamo, L.; Nikkila, EA.; Taskinen, MR. y Raivio, KO. *Postheparin plasma lipoprotein and hepatic lipases in preterm neonates.* Pediatr. Res., 1984. 18, p. 1104-7.

Rubecz, I. y Mestyan, J. *Energy metabolism and intravenous nutrition of premature infants.* Biol. Neonate, 1973. 23, p. 45-58.

Rudolph, FB.; Fanslow, EC.; Kulkarni, AD. y Van Buren, CT. *Effect of dietary nucleotides on lymphocyte maturation.* Prd. REs., 1985. 19, p. 773.

Rudolph, FB.; Kulkarni, AD.; Schandle, VB. y Van Buren, CT. *Involvement of dietary nucleotides in T lymphocyte function.* Exp. Med. Biol., 1984. 165, p. 175-178.

Sabel, KG.; Olegard, R.; Hildingsson, K. y Karlberg, P. *Effects of injected lipid emulsion on oxygen consumption, RQ, triglyceride, free-fatty-acid and beta hydroxybutyrate levels in small-for-gestational-age (SGA) infants.* Acta Paediatr. Scand., 1982. 71, p. 63-9.

Sabesin, SM.; Frase, S. y Ragland, JB. *Accumulation of nascent lipoproteins in rat hepatic Golgi during induction of fatty liver by orotic acid.* Lab. Invest., 1977. 37, p. 127-35.

Sánchez-Pozo, A.; Pita, ML.; Martínez, A.; Molina, JA.; Sánchez-Medina, F. y Gil, A. *Effect of dietary nucleotides up lipoprotein pattern of newborn infants.* Nutr. Res., 1986. 6, p. 763-771.

Sanguansermsri, J.; Gyorgy, P. y Zilliken, F. *Polyamines in human and cos's milk.* Am. J. Clin. Nutr., 1974. 27, p. 859-65.

Savaiano, DA. y Clifford, AJ. *Adenosine, the precursor of the nucleic acids in intestinal cells unable to synthetize purines de novo.* J. Nutr., 1981. 111, p. 1816-22.

Schanker, KS. y Tocco, DJ. *Active transport of some pyrimidines across the rat intestinal epithelium.* J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1960. 128, p. 115-21.

Schlag, B. y Winkler, L. *Konzentration und Zusammensetzung der serumlipoproteinklassen der fetalen ratte.* Acta Biol. Med. Ger., 1978. 37, p. 239-44.

Senterre, J.; Putet, G.; Salle, B.; Rigo, J. *Effects of vitamin D and phosphorus supplementation on calcium retention in preterm infants fed banked human milk.* J. Pediatr., 1983. 103, p. 305-307.

Senterre, J.; Voyer, M.; Putet, G. y Rigo, J. *Nitrogen, fat, and mineral balance studies in low-birth-weight infants fed with banked human milk, human milk formula or preterm formula.* En: Wiliams AF, Baun JD. eds. Human milk banking. Raven Press, Nueva York, 1984. p. 45-61.

Senterre, J. y Salle, B. *Calcium and phosphorus economy of the preterm infant and its interaction with vitamin D and its metabolites.* Acta Pediatr. Scand., 1982. Suppl 296, p. 85-92.

Shennan, AT.; Bryan, MH. y Angel, A. *The effect of gestational age on intralipid tolerance in newborn infants.* J. Pediatr., 1977. 91, p. 134.

Sherrill, BC. y Dietschy, JM. *Characterization of the sinusoidal transport process responsible for uptake of chylomicrons by the liver.* J. Biol. Chem., 1978. 253, p. 1859-67.

Sigurdsson, G.; Nicoll, A. y Lewis B. *Conversion of very low density lipoprotein to low density lipoprotein: A metabolic study of apolipoprotein B kinetics in human subjects.* J. Clin. Invest., 1975. 56, p. 1481-90.

Silver, M. *Fetal physiology and medicine.* Beard RW, Nathanielsz PW, ed. Saunders, Londres, 1976. p. 173-193.

Silver, WA. *Nomenclature for doration of gestation, birth weight and intrauterine growth.* Pediatrics, 1967. p. 39-935.

Skinner, ER.; Klopper, AI.; Wilson, GR. y Toop, KM. *The composition and concentration of umbilical cord plasma lipoproteins; their relationship to the birth weight and other clinical factors of the newborn.* Clin. Chim. Acta, 1983. 135, p. 219-28.

Snyderman, SE.; Holt, LE.; Dancis, J.; Roitman, E.; Boyer, E. y Balis, ME. *Unessential nitrogen: a limiting factor for human growth.* J. Nutr., 1962. 78, p. 57.

Sonoda, T. y Tatibana, M. *Metabolic fate pyrimidines and purine in dietary nucleic acids ingested by mice.* Biochem. Biophys. Acta, 1978. 521, p. 55-66.

Soutar, AK.; Garner, CW.; Baker, HN.; Sparrow, JT.; Jackson, RL.; Goto, AM. y Smith, LC. *Efect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidyl acyldonor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase.* Biochemistry, 1975. 14, p. 3057.

Spady, DW.; Picou, D. y Waterlow, JC. *Energy balance during recovery from malnutrition.* Am. J. Clin. Nutr., 1976. 29, p. 1073-89.

Srinivasan, SR.; McBride, JR.; Radhakrishnamurthy, B. y Berenson, GS. *Comparative studies on serum lipoproteins and lipid profiles in subhuman primates.* Comp. Biochem. Physiol., 1974. 47B, p. 711.

Stahl, GE.; Spear, ML. y Hamosh, M. *Intravenous administration of lipid emulsions to premature infants.* Clin. Perinatol., 1986. 13, p. 133-62.

Steinmetz, A.; Czekelius, P.; Thiemann, E.; Motzny, S. y Kaffarnik, H. *Changes of apolipoprotein A-IV in the human neonate: evidence for different inductions of apolipoproteins A-IV and A-I in the postpartum period.* Atherosclerosis, 1988. 69, p. 21-7.

Steinmetz, A. y Utermann, G. Arteriosclerosis, 1983. 3, p. 495.

Stozicky, F.; Slaby, P. y Volenikova, L. *The pattern of major serum apolipoproteins during the early neonatal period.* Acta Paediatr. Scand., 1982. 71, p. 239-41.

Stransky, E. y David-Laws, DF. *On kwashiorkor (infantile pellagra, malignant malnutrition).* Ann. Pediat., 1950. 174, p. 226-46.

Strobl, W.; Widhalm, K.; Kostner, G. y Pollak, A. *Serum apolipoprotein and lipoprotein (a) during the first week of life.* Acta Paediatr. Scand., 1983. 72, p. 505-9.

Sturman, JA.; Gaull, G. y Raina, NCR. *Absence of cysthationase in human fetal liver: Is cystine essential?.* Science, 1970. 169, p. 74.

Takayama, MSI.; Nagasaki, T. y Tanimuzu, I. *A new enzymic method for determination of serum choline-containing phospholipids.* Clin. Chin. Acta, 1977. 79, p. 93.

Tanaka, R. y Mutai, M. *Improved medium for selective isolation and enumeration of bifidobacterium.* Appl. Env. Microbiol., 1980. 40, 866-869.

Tantibhedhyangkul, P. y Hashim, SA. *Medium-chain triglyceride feeding in premature infants: effects on fat and nitrogen absorption.* Pediatrics, 1975. 55, p. 359-70.

Tantibhedhyangkul, P. y Hashim, SA. *Medium-chain triglyceride feeding in premature infants: effects on calcium and magnesium absorption.* Pediatrics, 1978. 61, p. 573-62.

Tenebaum, D.; Gambert, P.; Meunier, S.; d'Athis, P.; Nivelon, JL. y IaLLemand, C. *Serum lipoproteins in venous blood serum from birth to the end of the first week: feeding influences.* Biol. Neonate, 1988. 53, p. 126-31.

Toth, P.; Klujber, L.; Baranyai, Z. y Molnar, E. *Serum lipid and lipoprotein-cholesterol values in cord blood and on the sixth postnatal day in newborns of variyng maturity.* Acta Paediatr. Hung., 1984. 25, p. 275-81.

Trinder, P. Ann. Clin. Biochem., 1986. 6, p. 24-33.

Tsang, RC.; Glueck, CJ.; Evans, G. y Steiner, PM. *Cord blood hypertriglyceridemia.* Am. J. Dis. Child., 1974. 127, p. 78-82.

Tsang, RC.; Neely, K. y Glueck, CJ. *Hyperalphalipoproteinemia, birth to age two years.* Pediatr. Res., 1981. 15, p. 66-9.

Tsang, RC.; Fallat, RW. y Glueck, CJ. *Cholesterol at birth and age 1:comparison of normal and hypercholesterolemic neonates.* Pediatrics, 1974. 53, p. 458-70.

Uauy, R. y Gil. A. *Fatty acid metabolism en the neonate. Effect of age, diet and nucleotides. Proceedins III International Symposium on Infant Nutrition and Gastrointestinal Disease.* Brussels, Belgium, 1985, p. 65-75.

Uauy, R.; Saitua, MT.; Cassorla, X. y Gil, A. *Efectos de la dieta, nucleótidos y edad postnatal sobre la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana del recién nacido.* En: Avances en Nutrición de la Infancia. Granada, España: Uniasa-EDDA, 1985. p. 133-146.

Uauy, R. y Stringel, G. *Effect of dietary nucleotides (DN) on growth and maturation of the developing gut in the rat.* Ped. Res., 1988. 23, p. 493A.

Uauy, R. *Dietary nucleotides and requirements in early life.* En: Texbook of Gastroenterology and Nutrition in infancy, 2nd ed, Lebenthal E. ed, New York, Raven Press, 1989. p. 265-280.

Van Biervliet, JP.; Rosseneu, M. y Caster, H. *Influence of dietary factors on the plasma lipoprotein composition and content in neonates.* Eur. J. Pediatr., 1986. 144, p. 489-93.

Van Biervliet, JP.; Rosseneu, M.; Bury, J.; Caster, H.; Stul, MS. y Lamote, R. *Apolipoprotein and lipid composition of plasma lipoproteins in neonates during the first month of life.* Pediatric. Res., 1986. 20, p. 324-8.

Van Biervliet, JP.; Vercaemst, R.; De Keersgieter, W.; Vinamoint, N.; Caster, H. y Rosseneu, M. *Evolution of lipoprotein patterns in newborns.* Acta Paediatr. Scand., 1980. 69, p. 593-6.

Van Biervliet, JP., Vinaimont, N.; Caster, H.; Vercaemst, R. y Rosseneu, M. *Plasma apoprotein and lipid patterns in newborns: Influence of nutritional factors.* Acta Paediatr. Scand., 1981. 70, p. 851-6.

Van Buren, CT.; Kulkarni, AD.; Fanslow, WC. y Rudolph, FB. *Dietary nucleotides: A requirement for helper/inducer T lymphocytes.* Transplantation, 1985. 40, p. 694-[illegible].

Van Buren, CT.; Kulkarni, AD.; Rudolph, FB. *Nucleotide deprivation retards cutaneous hypersensitivity (DCH).* JPEN., 1983. 6, p. 582.

Van Buren, CT.; Kulkarni, AD.; Rudolph, FB. *Synergistic effect of a nucleotide-free diet and cyclosporine on allograft survival.* Transplant. Proc., 1983. 15, p. 2967-2968.

Van Buren, CT.; Kulkarni, AD.; Schandle, VB. y Rudolph, FB. *The influence of dietary nucleotides on cell-mediated immunity.* Transplantation, 1983. 36, p. 350-352.

Vitetri, FE.; Flores, JM.; Alvarado, J. y Behar, M. *Intestinal malabsorption in malnourisehd children before, and during recovery. Relation between severity of protein deficiency and the malabsorption process.* Am. J. Dig Dis., 1973. 18, p. 201-11.

Von Euler, LH.; Rubin, RJ. y Handschumacher, RE. *Fatty livers induced by orotic acid. II. Changes in nucleotide metabolism.* J. Biol. Chem., 1963. 238, p. 2464-2469.

Walther, FJ. y Ramaekers, LHJ. *Growth in early childhood of newborns affected by disproportionate intrauterine growth retardation.* Acta Paediatr. Scand., 1982. 71, p. 651-6.

Walther, FJ. y Ramaekers, LHJ. *Neonatal morbidity of SGA infants in relation to their nutritional status at birth.* Acta Paediatr. Scand., 1982. 71; 437-40.

Watkins, JB.; Szezepanik, P.; Gould, JB.; et al. *Bile salt metabolism in the human premature infant.* Gastroenterology, 1975. 69, p. 706.

Webber, LS.; Cresenta, JL.; Voors, AW. y Berenson, GS. *Tracking of cardiovascular disease risk factor variables in school-age children.* J. Chron. Dis., 1983. 36, p. 647-60.

Wiese, HF.; Bennet, MO. y Braun, IHG. *Blood serum lipid patterns during infancy and childhood.* Am. J. Clin. Nutr., 1966. 18, p. 155-64.

Wilson, DW. y Wilson, HC. *Studies in vitro of the digestion and absorption of purine ribonucleotides by the intestine.* J. Biol. Chem., 1961. 237, p. 1643-47.

Windmuller, HG. y Levy, RL. *Total inhibition of hepatic beta-lipoprotein production in the rat by orotic acid.* J. Biol. Chem., 1967. 242, p. 2246-54.

Winkler, E.; Chao, YS. y Havel, RJ. *Determinants of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants in the rat.* J. Biol. Chem., 1980. 255, p. 5475-80.

Winkler, L.; Schlag, B. y Goetz, E. *Concentration and composition of the lipoproteins classes in human umbilical cord serum.* Clin. Chim. Acta, 1977. 76, p. 187-91.

Yamaguchi, N.; Kodama, N. y Ulda, K. *Diadenosine tetraphosphate as a signal molecule linked with the functional state of a liver.* Gastroenterology, 1985. 89, p. 723.

Zaidan, H.; Dnanireddy, R.; Hamosh, M.; Pramanik, AK.; Chowdhry, P. y Hamosh, P. *Effect of continuous heparin administration on intralipid clearing in very-low-birth-weight infants.* J. Pediatr., 1982. 101, p. 599.

Zee, P. *Lipid metabolism in the newborn. II Neutral lipids.* Pediatrics, 1975. 41, p. 640-5.

Zoppi, G.; Andreotti, G.; Pajno-Ferrara, F.; Njai, DM. y Gaburro, D. Pediatr. Res., 1972. 6, p. 880-886.