

TESIS DOCTORAL

LA LECHE DE CABRA EN NUTRICIÓN INFANTIL: UNA FUENTE DE NUEVOS INGREDIENTES FUNCIONALES

*(GOAT'S MILK IN INFANT NUTRITION: A NEW SOURCE OF FUNCTIONAL
INGREDIENTS)*

Federico Lara Villoslada

Granada, 2005



Universidad de Granada
Departamento de Bioquímica
Y Biología Molecular



Área de Biomedicina



Unité de Nutrition et
Métabolisme Protéique

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Federico Lara Villoslada
D.L.: Gr. 733 - 2005
ISBN: 84-338-3372-3

LA LECHE DE CABRA EN NUTRICIÓN INFANTIL: UNA FUENTE DE NUEVOS INGREDIENTES FUNCIONALES

Memoria que presenta el Farmacéutico Federico Lara Villoslada para aspirar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Granada.

Los trabajos que se exponen en esta Memoria de Tesis Doctoral han sido realizados en el Área de Biomedicina de Puleva Biotech S.A. bajo la dirección del Dr. Jordi Xaus Pey y la Dra. Mónica Olivares Martín, bajo la tutela de la Pra. Dra. M^a Dolores Girón González, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada y en colaboración con el *Institut National de la Recherche Agronomique* (Clermont-Ferrand, Francia).

Dr. Jordi Xaus Pey

Dra. Mónica Olivares Martín

Dra. M^a Dolores Girón
González

Índice

SUMMARY	xiii
ABREVIATURAS	xxv
INTRODUCCIÓN	3
1. La leche materna: primera elección para el recién nacido	3
1.1. Etapas de la lactancia	3
1.2. Composición nutricional de la leche humana	4
1.2.1. Composición proteica.	4
1.2.2. Composición glucídica.	10
1.2.3. Composición lipídica.	12
1.2.4. Minerales.	15
1.2.5. Vitaminas.	16
1.2.6. Nucleótidos.	16
1.2.7. Poliaminas.	17
1.2.8. Microbiota de la leche humana.	18
1.3. Principales beneficios de la lactancia materna.	19
1.3.1. La leche humana confiere protección frente a infecciones gastrointestinales y respiratorias.	19
1.3.2. La leche humana modula la respuesta inmunológica del lactante.	22
1.3.3. Beneficios para la madre.	23
1.3.4. Beneficios económicos de la lactancia.	24
2. La lactancia artificial como alternativa a la leche humana.	25
2.1. Requisitos legales de las fórmulas infantiles.	25
2.1.1. Definición de una fórmula infantil.	26
2.1.2. Características de las fórmulas de inicio.	27
2.1.3. Características de las fórmulas de continuación.	31
2.2. Nuevos componentes bioactivos de las fórmulas infantiles	32
2.2.1. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.	33
2.2.2. Probióticos y prebióticos.	36
2.3. Fórmulas infantiles especiales.	38
2.3.1. Fórmulas sin lactosa.	39
2.3.2. Fórmulas a base de proteínas hidrolizadas y fórmulas de proteínas vegetales.	39

2.3.3. Fórmulas para prematuros y recién nacidos de bajo peso.	40
2.3.4. Fórmulas antiregurgitación.	40
3. La leche de cabra ¿una alternativa válida?.	43
3.1. Mercado de la leche de cabra.	45
3.2. Principales diferencias en la composición de las leches de vaca y cabra.	44
3.2.1. Diferencias en la composición proteica.	45
3.2.2. Diferencias en la composición lipídica.	45
3.2.3. Diferencias en la composición glucídica.	47
3.2.4. Diferencias en la composición mineral.	48
3.2.5. Diferencias en la composición vitamínica.	50
3.2.6. Otros componentes minoritarios.	51
3.3. La leche de cabra en nutrición infantil.	54
3.3.1. Antecedentes de la utilización de leche de cabra en nutrición infantil.	54
3.3.2. ¿Es adecuada la leche de cabra para la nutrición infantil?	55
4. Lactancia artificial y la salud del recién nacido.	57
4.1. Alergia a la proteína de la leche de vaca y posibles medios de prevención.	58
4.1.1. APLV: frecuencia, síntomas y posibles causas de su incremento.	58
4.1.2. El fenómeno de la tolerancia oral.	60
4.1.3. Sustitutos de la leche humana en niños con APLV.	61
4.1.4. Prevención de la APLV: posible papel de la leche de cabra.	64
4.2. Enterocolitis necrotizante (ECN): la enfermedad inflamatoria intestinal del recién nacido.	66
4.2.1. Factores de riesgo en la ECN.	67
4.2.2. Papel de la nutrición del neonato en la ECN.	69
4.3. Otras enfermedades relacionadas con la nutrición del recién nacido.	69

4.3.1. Diarrea por infección gastrointestinal.	69
4.3.2. Diarrea por intolerancia a la lactosa.	70
4.3.3. Diabetes <i>mellitus</i> tipo I.	71
OBJETIVOS	75
METODOLOGÍA	79
5. Análisis de la alergenicidad de la leche de vaca.	79
5.1. Análisis comparativo de la alergenicidad de las leches de vaca y cabra.	79
5.1.1. Animales y diseño experimental.	79
5.1.2. Evaluación de los síntomas.	81
5.1.3. Determinación de parámetros plasmáticos.	82
5.1.4. Cultivo de linfocitos procedentes del bazo.	83
5.1.5. Análisis de la expresión génica por RT-PCR.	85
5.1.6. Análisis estadístico.	86
5.2. Evaluación del efecto de la relación caseínas/proteínas (C/PL) del lactosuero sobre la alergenicidad de la leche de vaca.	86
5.2.1. Modificación de la proporción C/PL de la leche de vaca.	87
5.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).	88
5.2.3. Animales y diseño experimental.	88
5.2.4. Parámetros analizados.	89
5.3. Influencia de la APLV en posteriores fenómenos de alergia.	89
5.3.1. Animales y diseño experimental.	89
5.3.2. Parámetros analizados.	91
5.4. Hidrólisis de las proteínas lácteas por bacterias probióticas e influencia sobre su alergenicidad.	91
5.4.1. Hidrólisis enzimática de la leche de vaca.	91
5.4.2. Hidrólisis de las proteínas lácteas por bacterias probióticas.	92
5.4.3. Análisis de la distribución de pesos moleculares de los péptidos resultantes.	92
5.4.4. Animales y diseño experimental.	93

5.4.5. Parámetros analizados.	93
6. Efecto de la leche de cabra sobre el sistema inmunitario.	95
6.1. Comparación del efecto de dietas a base de leche de vaca y de cabra sobre el sistema inmunitario.	95
6.1.1. Preparación de las dietas.	95
6.1.2. Diseño experimental.	96
6.1.3. Determinación de parámetros plasmáticos.	97
6.1.4. Cultivo de linfocitos aislados de bazo.	97
6.1.5. Efecto de las diferentes dietas sobre lactobacilos y bifidobacterias de la flora fecal.	98
6.1.6. Análisis estadístico.	98
7. Efectos funcionales de los oligosacáridos de leche de cabra.	99
7.1. Aislamiento de los oligosacáridos de leche de cabra.	99
7.2. Ensayos de actividad <i>in vitro</i> y transporte a través del epitelio intestinal.	99
7.2.1. Ensayo de inhibición de la adhesión de microorganismos patógenos.	99
7.2.2. Ensayo de capacidad prebiótica.	101
7.2.3. Transporte a través de un modelo <i>in vitro</i> de epitelio intestinal.	102
7.3. Efecto de los oligosacáridos en modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal.	104
7.3.1. Efecto de los fructooligosacáridos en un modelo de inflamación intestinal por TNBS.	104
7.3.2. Efecto de una dieta rica en oligosacáridos de leche de cabra en ratas con colitis inducida por sulfato de dextrano.	110

8. Péptidos bioactivos de la leche de cabra.	117
8.1. Obtención de péptidos a partir de las caseínas de la leche de cabra.	117
8.2. Ensayos de transporte a través del epitelio intestinal.	117
8.3. Ensayos de actividad antimicrobiana.	118
8.4. Ensayos de inmunomodulación.	119
8.4.1. Ensayos de actividad sobre macrófagos.	120
8.4.2. Proliferación de linfocitos.	121
8.4.3. Determinación de actividad antiinflamatoria por inhibición de metaloproteasas.	121
RESULTADOS	125
9. Alergenicidad de la leche de vaca.	125
9.1. Análisis comparativo de la alergenidad de las leches de vaca y cabra.	125
9.1.1. Evaluación de l estado de los animales.	126
9.1.2. Papel de los linfocitos en el desarrollo de la APLV.	128
9.1.3. Parámetros plasmáticos.	129
9.1.4. Resumen de los resultados.	132
9.2. Influencia de la relación C/PL en la alergenidad de la leche de vaca.	133
9.2.1. Modificación de la relación C/PL de la leche de vaca.	134
9.2.2. Evaluación del estado de los animales.	134
9.2.3. Proliferación de linfocitos.	135
9.2.4. Parámetros plasmáticos.	136
9.2.5. Resumen de los resultados.	138
9.3. Influencia de la APLV sobre posteriores fenómenos de alergia.	138
9.3.1. Inducción de sensibilización frente a proteínas lácteas.	139

9.3.2. Influencia sobre la sensibilización frente a otros alergen	139
9.3.3. Resumen de los resultados.	140
9.4. Hidrólisis de las proteínas lácteas por probióticos y efectos sobre su alergenicidad.	141
9.4.1. Hidrólisis enzimática y por probióticos de las proteínas de la leche de vaca.	142
9.4.2. Evaluación del estado de los animales.	142
9.4.3. Parámetros plasmáticos.	143
9.4.4. Resumen de los resultados.	144
10. Efecto de la leche de cabra sobre el sistema inmunitario.	147
10.1. Comparación del efecto de dietas a base de leche de vaca o de cabra sobre el sistema inmunitario de ratones.	147
10.1.1. Dietas y evolución del peso de los animales.	147
10.1.2. Efecto de las dietas sobre la respuesta linfocitaria.	148
10.1.3. Parámetros plasmáticos.	150
10.1.4. Efectos sobre los lactobacilos y bifidobacterias de la lora intestinal.	151
10.1.5. Resumen de los resultados.	152
11. Efectos funcionales de los oligosacáridos de leche de cabra.	155
11.1. Obtención de oligosacáridos a partir de leche de cabra.	155
11.2. Ensayos de actividad <i>in vitro</i> .	157
11.2.1. Inhibición de la adhesión de microorganismos patógenos.	157
11.2.2. Capacidad prebiótica de los oligosacáridos de leche de cabra.	158
11.2.3. Ensayo de transporte.	159
11.2.4. Resumen de los resultados.	162

11.3. Efecto de los oligosacáridos en modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal.	162
11.3.1. Efecto de los FOS en un modelo de inflamación intestinal por TNBS.	163
11.3.2. Efecto de una dieta rica en oligosacáridos de leche de cabra en ratas con colitis inducida por sulfato de dextrano.	171
12. Bioactividad de los péptidos obtenidos a partir de leche de cabra.	185
12.1. Obtención de péptidos a partir de las caseínas de la leche de cabra y transporte a través del epitelio intestinal.	185
12.2. Actividad antimicrobiana de los péptidos.	186
12.3. Efectos inmunomoduladores.	187
12.3.1. Actividad sobre macrófagos de ratón.	187
12.3.2. Efecto sobre la proliferación de linfocitos.	189
12.3.3. Actividad antiinflamatoria por inhibición de la MMP-3.	190
12.4. Resumen de los resultados.	191
DISCUSIÓN	197
CONCLUSIONES	215
BIBLIOGRAFÍA	219
APÉNDICE	c

Summary

It has been widely accepted that breastfeeding is the best food for infants, since it fulfils all the nutritive requirements for optimal growth. Breast milk also contains a number of protective and immunoregulatory components, such as immunoglobulins, immunocompetent cells or different antimicrobial compounds, that may have a beneficial effect on the development of the infant's immune system. In this sense, several studies have shown that breastfeeding protects the newborn against infectious diseases. Breast milk also contains other beneficial components such as nucleotides, antioxidants and prebiotic substances with demonstrated healthy effects.

Although human milk should be the first choice for the newborn infant, milk substitutes play an indispensable role in infant nutrition, when breastfeeding is impossible or undesirable.

Initially infant formulas were designed to provide infants with the required nutrients for adequate growth and development. However, at the beginning of the 21st century this is not enough and, at present, research is mainly focused on the bioactive components present in human milk and responsible for some of the functional effects observed in breast-fed infants.

Goat's milk (GM) was frequently in infant nutrition up to the end of the 19th century, when it suffered an important disrepute, principally in Europe, due to several microbiological safety studies comparing sterilized cow's milk (CM) with non-treated GM. It was also discarded for infant nutrition because it has a low concentration of folic acid.

Actually these disadvantages can be easily solved and it has been proved that goat's milk has several advantages for infant nutrition, that make it more similar to human milk:

- High protein digestibility and a less content of α 1-casein, one of the most important allergens in CM.
- GM is rich in medium chain triglycerides (MCT), that means an easier lipid digestion and a greater energy expenditure, since they are rapidly oxidized in the liver.
- It also has a high concentration and variability of oligosaccharides, which are similar to those of human milk.

- It contains a lot of bioactive compounds, such as polyamines, sialic acid, growth factors, etc.

Recently it has been published a positioning paper of the (European Food Safety Authority (EFSA) about the use of GM in infant nutrition. In this paper it is stated that there is not sufficient data to support that the use of GM as a protein source in infant formulas has a benefit respect to actually used protein sources, namely CM and soy protein.

In this context, the main aim of this work was to evaluate GM as a source of new bioactive ingredients in infant nutrition, in order to mimic some of the functional effects shown by breastfed children. With this main objective we have focused our investigation in the following issues:

- Modifications in the protein fraction of infant formulas in order to reduce the incidence of cow's milk protein allergy (CMPA) and other atopic diseases related to CMPA. With this objective we analyzed:
 - Allergenicity of GM protein as a substitute of CM protein in non-sensitized children.
 - Evaluation of the effects of CMPA in the sensitization against other allergens.
 - Influence of a modification of the caseins/whey proteins ratio in the allergenicity of CM.
 - Reduction of the allergenicity of CM by hydrolysis of CM proteins by probiotic bacteria.
- Immunomodulatory properties of GM.
- Bioactivity of oligosaccharides isolated from GM, with special attention in their influence on intestinal microbiota and effects on animal models of intestinal inflammation.
- Characterization of peptides from GM and their functional effects principally on immune system.

The most relevant results are exposed subsequently:

Modifications in the protein fraction of infant formulas to reduce its allergenicity

Allergenicity of GM

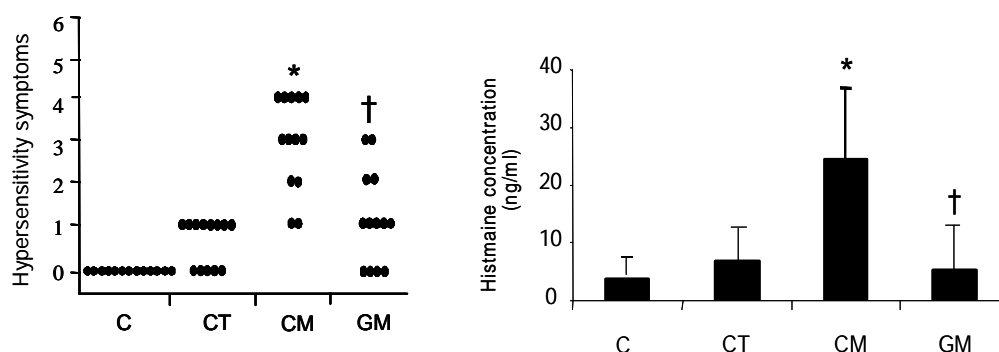
The use of GM as an alternative of CM in children with CMPA has been rejected because of the cross-reactivity between milk proteins of these two mammals species. However, few studies have evaluated the allergenicity of GM in non-sensitized children, in spite of the lower content of an important allergen (α 1-casein) in GM.

We evaluated the allergenicity of GM, compared to CM, in a murine model of CMPA, using mice just after weaning, what means non-sensitized to CM proteins. Animals were first sensitized to CM or GM by six doses administered weekly. Then the allergic reaction was triggered by challenging mice with CM or GM.

Animals sensitized to GM proteins showed a lower percentage of diarrhea during the sensitization period than those sensitized to CM. The allergic reaction was also weaker in GM-sensitized mice, as shown by a lower hypersensitivity score. Serum cow-milk specific IgG1 and histamine levels were also significantly higher in CM-sensitized mice.

The evaluation of the lymphocyte function showed an induction of a T_H2 response by CM proteins. In contrast GM proteins failed to induced such a response, as shown by the lower levels of T_H2 cytoquines (IL-4) and higher production of Th1 cytoquines (IFN- γ). In addition, GM induced a lower lymphocyte sensitization as a result of a significant decrease in the specific proliferation ratio of these cells.

In conclusion, GM induced a lower sensitization than CM in the murine model of milk atopy used. These result suggest that GM could be less allergenic than CM when used as the first protein source after a breast-feeding period.



Hypersensitivity symptoms and serum histamine concentration in mice sensitized to CM or GM. C:control, CT:cholera toxin control, CM:cow's milk sensitized mice, GM:goat's milk sensitized mice. P<0.05 vs C and CT, † P<0.05 vs CM.*

The lower allergenicity of GM could be a benefit not only for infant but also for adults, since children suffered from CMPA have a higher risk to develop other allergic diseases later in life. This could be due to the stimulation of the immune system caused by milk proteins, which could favoured the sensitization to other allergens. This issue has been evaluated in our murine model of CMPA. During the sensitization period a group of mice received orally other allergen (ovalbumin) and then an allergic reaction was triggered by intraperitoneal administration of this allergen. Mice sensitized to GM showed a weaker sensitization to ovalbumin, suggesting that the less allergenicity of GM could partially prevent sensitization to other allergens.

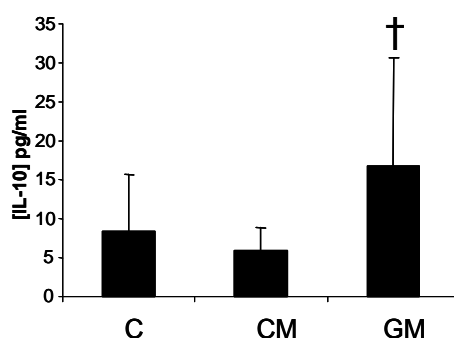
The reason why GM could be less allergenic should be further investigated, but it could be due to the lower content of α 1-casein. This hypothesis has been evaluated in this work, using the same murine model of CMPA. We have demonstrated that a modified cow's milk with a caseins/whey proteins ratio of 40/60 is less allergenic than native CM, whose ratio is 80/20.

In order to investigate other possible explanation for the lower allergenicity of GM, we decide to evaluate the effects of GM on the immune system. With this aim CM and GM were used to prepare two powder diets, that were used to feed two groups of mice during one month. After this period mice were sacrificed and lymphocyte function as well as the faecal microbiota were evaluated.

The main difference between CM and GM in the immune system was the higher production of IL-10 in the GM group. This T_H3 cytokine down-regulates both T_H1 and T_H2 responses and could be responsible for the lower allergenicity of

GM. In contrast, CM seems to stimulate lymphocyte proliferation and T_H2 response.

These results suggest that some components in GM could modulate the immune response. Further investigation is needed to evaluate the beneficial effects of GM on the immune function and, regarding infant nutrition, their possible role in the development and maturation of the immune system.



IL-10 concentration in plasma of mice fed a control diet (C) a CM based diet (CM) and a GM based diet. † statistically different from CM group.

Hydrolysis of CM proteins by probiotic bacteria

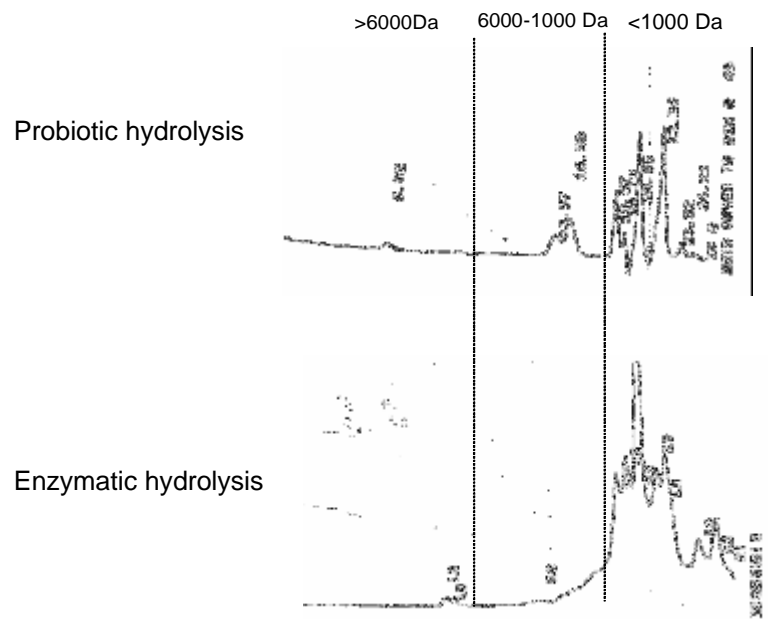
The most used alternative to CM in infant with CMPA are hydrolyzed formulas. CM is submitted to an enzymatic hydrolysis in order to reduce the size of milk peptides up to a molecular weight lower than 3000 Da, which are not allergenic.

As probiotic bacteria have also proteases capable of degrading milk proteins, we used two *Lactobacillus* strains to hydrolyze CM in order to reduce its allergenicity. The hydrolysate thus obtained was tested in the murine model of CMPA described above and it was compared to an enzymatic hydrolysate. The role of probiotics was also evaluated by sensitizing mice with CM supplemented with the same lactic acid bacteria used for milk protein hydrolysis.

In spite of the fact that hydrolysis by probiotics was less intensive than the enzymatic one, the reduction in allergenicity in both products was very similar. Comparing to untreated CM, sensitization of mice with both, enzymatic and probiotic hydrolysate, resulted in a lower concentration of specific IgG1 and histamine in the plasma of mice.

This result suggests that apart from protein hydrolysis probiotic bacteria could play a role in allergenicity. In fact, mice receiving CM supplemented with probiotics showed a lower induction of T_H2 response, as shown by a decreased in plasma IL-4 concentration compared to mice sensitized to untreated CM.

The manipulation of the intestinal flora of infants by probiotic could be an interesting way to prevent CMPA, since probiotics seems to reduce milk allergenicity by protein hydrolysis and down-regulate the T_H2 response.



Molecular weight distribution (by SE-HPL) in CM hydrolyzed by probiotics or an enzymatic process

Bioactivity of oligosaccharides isolated from GM

GM was submitted to ultrafiltration process in order to isolate oligosaccharides. The analysis of the final product revealed that oligosaccharides from GM resembled some characteristics of that of human milk, which have demonstrated their functional effects.

We used *in vitro* assays to evaluate the prebiotic effects of goat milk oligosaccharides as well as their capacity to inhibit the adhesion of pathogenic bacteria to intestinal cells.

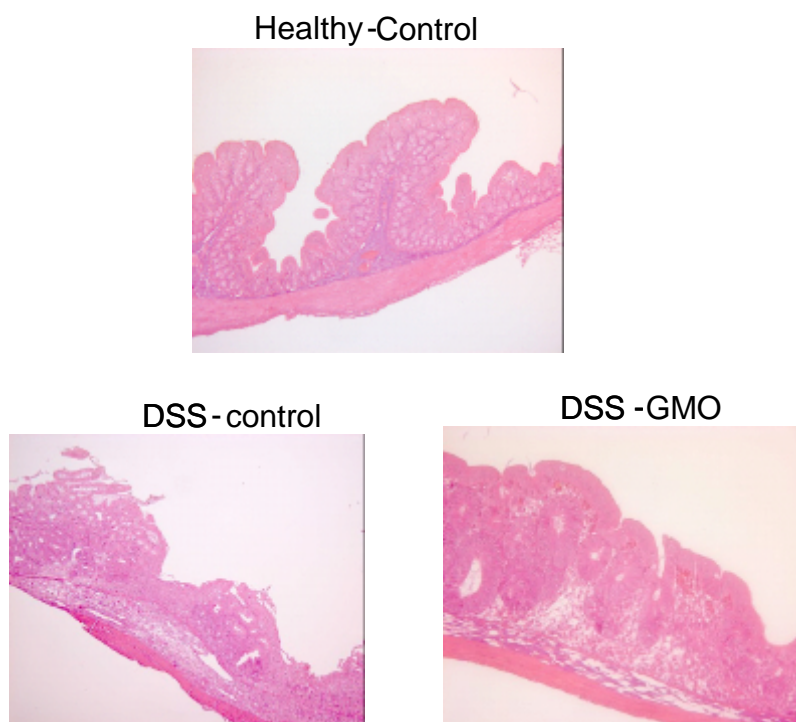
Our results suggest that GM oligosaccharides have a prebiotic effect by selectively stimulating the growth of the bifidobacteria tested. It was also demonstrated the ability of these carbohydrates to inhibit the adhesion of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* ssp. *Ohio* to the intestinal epithelium.

Once we have tested their beneficial effects on intestinal microbiota, we studied these compounds in a rat model of intestinal inflammation, frequent in newborns suffering from necrotizing enterocolitis. This pathology is highly influenced by the intestinal flora, and thus oligosaccharides could play an important role.

20 rats were divided in two groups fed the same diet but with different sources of fiber (5% of the diet): cellulose for control rats or a mixture of goat milk oligosaccharides (GMO) and cellulose for GMO-rats. DSS treatment was used to induce a colonic inflammatory process followed by a recovering period. In order to evaluate effects due to the anorexia, two more groups of rats (n=10 per group) were pair-fed to treated rats and were rendered healthy. During all the study, body weight, food intake as well as clinical symptoms were daily recorded. After the recovering period, colon MPO activity was measured as a marker of neutrophil infiltration and microscopic colonic lesions were analyzed. Finally, intestinal microflora and gene expression by DNA microarray technology were evaluated.

DSS treatment induced a decrease in food intake and in body weight which was not observed in rats fed the GMO diet. DSS also caused an acute colonic inflammatory process which was significantly weaker in rats fed the GMO, as shown by a lower colon MPO activity as well as less severe clinical symptoms. GMO-rats also showed less severe colonic lesions and a more favourable intestinal microbiota, with a significant decrease in potentially pathogenic bacteria. The expression of genes involved in intestinal repair (mucines and growth factors, among others) which was down-regulated in DSS-control rats, returned to normal values in rats fed the GMO.

Our results suggest that oligosaccharides from goat milk reduce intestinal inflammation caused by DSS treatment and contribute to the recovery of damaged colonic mucosa, normalizing the expression of genes implicated in intestinal function.



Colonic lesions caused by DSS treatment and recuperation in a rat fed GMO

Bioactive peptides in GM

It has been widely demonstrated the presence of peptides in CM with functional effects, specially regarding immune system. In spite of the fact that GM proteins are similar to that of CM, the presence of bioactive peptides in GM has not been investigated.

In our work, caseins from GM were hydrolyzed with a mixture of proteases, to obtain an hydrolysate which was then incubated in an *in vitro* model of intestinal epithelium, in order to select those peptides capable of passing through the intestinal barrier. These peptides were identified and their immunomodulation activity was investigated.

Among all the peptides in the hydrolysate, three of them had the capacity to pass through the intestinal epithelium. Their aminoacids sequence was as follows:

P1: TGPIP

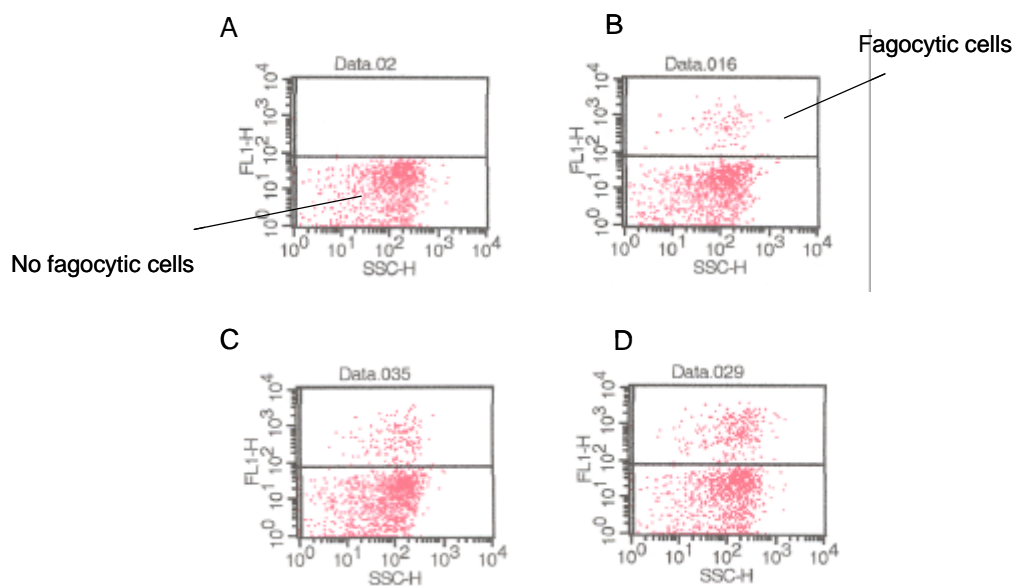
P2: SLPQ

P3: SQPK

The so called P3 enhanced the fagocytic activity of macrophages without inducing the production of proinflammatory cytoquines. This effect could be useful in the newborn defence against microorganisms.

Our results also demonstrated that P1 inhibit the metalloprotease-3 (MMP-3) activity. This enzyme is implicated in the tissular damage observed in different pathologies, such as necrotizing enterocolitis. It is also implicated in inflammation, suggesting an anti-inflammatory role of P1.

Therefore, GM caseins contain peptides with certain immunomodulatory properties, which could be useful in infant nutrition. Further investigation is needed to elucidate other functional effects of these peptides and to study such bioactivity in peptides obtained from the other type of protein in GM, namely whey proteins.



Fagocytic activity in macrophages incubated at 4°C (A-no fagocytosis), without any stimulus (B) or in the presence of the GM peptide P3 alone (C) or together with LPS (D)

With all these data GM seems to be a potential source of new functional ingredients in infant nutrition. We have demonstrated that GM protein is less allergenic than CM protein when administered to non-sensitized mice. Thus GM could be an alternative to CM, protecting the newborn not only from APLV but also from sensitizations to other allergens that could trigger other allergic diseases later in life. So the substitution of CM proteins by GM proteins could be taken into account in the prevention of APLV.

GM also contains other bioactive compounds, such as oligosaccharides, which could be potential functional ingredients in infant nutrition. Our results suggest that these carbohydrates, which are very similar to those isolated from human milk, have an important functional effect on the gastrointestinal tract.

Finally, we have also obtained peptides from GM with functional effects on the immune system.

Further investigation is needed, specially clinical studies, to confirm these results and demonstrate that GM could improve the functional effects of infant formulas actually available.

Abreviaturas

ACE: enzima angiotensina convertasa.
AGCC: ácidos grasos de cadena corta.
AGPI-CL: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.
ALA: α -linoleic acid (ácido α -linolénico).
APLV: alergia a la proteína de leche de vaca.
ATCC: Asociación Americana de Cultivos Celulares Tipo.
BAL: bacterias ácido-lácticas.
BSA: bovine serum albumin (albúmina bovina sérica).
ConA: concanavalina A.
COT:
C/PL: caseínas/proteínas del lactosuero.
DHA: docosahexaenoic acid (ácido docosahexaenoico).
DO: densidad óptica.
DTNB: ácido ditíio-nitrobenzoico.
ECN: enterocolitis necrotizante.
EDTA: etilen-diamino tetraacetic acid (ácido etilen-diamino tetraacético)
EEM: error estándar medio.
EGF: epidermal growth factor.
ESPGHAN: European Society of Pediatric Gastroenterology Hepathology and Nutrition (Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica).
FAO: Food and Drug Organisation (Organización de Alimentación y Medicamentos).
FAP: factor activador de plaquetas.
FeH: fórmulas extensamente hidrolizadas.
FpH: fórmulas parcialmente hidrolizadas.
FPLC: fast protein liquid chromatography (cromatografía líquida de media presión).
FOS: fructooligosacáridos.
GH: growth hormone (hormona de crecimiento).
GLA: γ -linoleic acid (ácido γ -linolénico).
GOS: galactooligosacáridos.
IBD: Inflammatory bowel disease (Enfermedad inflamatoria intestinal)
IGF I y II: insulin-like growth factor I y II (factor de crecimiento similar a la insulina I y II).

INRA: Institute Nationale de la Recherche Agronomique (Instituto Nacional de Investigación Agrónoma).

LA : linoleic acid (ácido linoleico).

LB: medio de cultivo Luria Bertani.

LPL: lipoprotein-lipasa.

LPS: lipopolisacárido.

MMP-3: metaloproteasa-3 (también llamada estromalisina-1).

MPO: mieloperoxidasa.

MRS: medio de cultivo de Man, Ragosa, Sharpe.

NK: natural killer.

PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

PLV: proteínas de leche de vaca.

PLC: proteínas de leche de cabra.

RD: Real Decreto.

RET: resistencia eléctrica trans-epitelial.

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa).

SCF: Safety Committee on Food (Comité de Seguridad Alimentaria).

SDS: sodium dodecyl sulphate (lauril-sulfato sódico).

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante.

TCM: triglicéridos de cadena media.

TCL: triglicéridos de cadena larga.

TGF- α/β : transforming growth factor- α/β (factor de crecimiento transformante- α/β)

TMB: 3,3'-5,5'-tetrametil-bencidina.

TNBS: ácido trinitro-benzeno sulfónico.

TSB: tryptic soy broth culture medium.

Introducción

1. LA LECHE MATERNA: PRIMERA ELECCIÓN PARA EL RECIÉN NACIDO.

La leche materna es el alimento ideal durante los primeros meses de vida del niño, lo cual es obvio puesto que se trata de un fluido biológico específico de la especie humana, cuya composición ha sido adaptada a lo largo de la evolución del hombre para satisfacer las necesidades nutricionales, fisiológicas e inmunológicas del niño.

La lactancia materna proporciona una combinación única de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, minerales, vitaminas, enzimas y células vivas, que no sólo es la ideal desde un punto de vista nutricional, sino que además aporta beneficios inmunológicos, psicológicos e incluso económicos (Kunz C y col, 1999). Así, en su composición se incluyen hormonas, factores de crecimiento, enzimas, péptidos bioactivos, oligosacáridos, nucleótidos, poliaminas y ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena (AGPI-CL). Aunque el conocimiento actual sobre muchos de estos compuestos es limitado, hay datos suficientes para apoyar la hipótesis de que todos ellos ejercen funciones importantes en el desarrollo y crecimiento del recién nacido.

1.1 **Etapas de la lactancia**

Se entiende por lactancia materna el primer periodo de vida, que comprende varios meses, durante los cuales el recién nacido se alimenta única y exclusivamente de leche humana. En función de la composición de la leche humana se distinguen varias fases en la lactancia materna (Nascimento MBR y col, 2003):

- **calostro**: es un líquido amarillento de alta densidad que llena las células alveolares durante el último trimestre de gestación. Su alto contenido en proteínas y minerales, así como su baja concentración de grasa y lactosa reflejan las necesidades del recién nacido durante la primera semana de vida. Además el calostro es rico en inmunoglobulinas, lactoferrina y leucocitos, y facilita el crecimiento de *Lactobacillus bifidus* en el tracto gastrointestinal.
- **leche de transición**: esta segunda fase se extiende hasta la segunda semana post-parto. Durante estos días la composición del calostro

cambia, con un descenso en la concentración de inmunoglobulinas, proteínas, factores de crecimiento y oligosacáridos, y un aumento de lactosa y de grasa, hasta alcanzar la composición de la leche madura.

- leche madura: en esta última fase la leche es ya una mezcla de tres fracciones: emulsión (gotas de grasa), suspensión (micelas de caseína) y solución (componentes solubles en agua). Los componentes nutricionales de esta leche madura dependen de varios factores como pueden ser el estado nutricional de la madre, la edad, la fase de lactancia y la hora del día, así como otros aspectos individuales de la madre lactante (Rodríguez-Palmero M y col, 1999).

1.2 Composición nutricional de la leche humana

La leche humana contiene un 12% de sólidos y su osmolaridad es similar a la del plasma. Por tanto, la lactancia exclusiva, sin suplementación de agua, mantiene al niño perfectamente hidratado (Akrê J, 1994).

Para el análisis de sus macro y microcomponentes hay que tener en cuenta que la leche humana es un alimento en continua evolución ya que su composición varía con la fase de la lactancia (ver punto 1.1). Además, como ya se ha comentado, también depende de factores individuales de la madre lactante. Por esta razón nos referiremos a lo que se conoce como “composición media de la leche materna”, que es la que se utiliza como referencia para la elaboración de las fórmulas adaptadas a lactantes (tabla 1-1).

1.2.1. Composición proteica:

El contenido total de proteínas de la leche humana es el más bajo de todos los mamíferos (0,8-1,2% frente a 3,3% de las leches de vaca y de cabra), debido al crecimiento relativamente lento del niño.

La relación entre caseínas y proteínas del lactosuero influye en los beneficios de la leche materna

Las proteínas de la leche humana se dividen en caseínas y proteínas del lactosuero. La relación caseína/proteínas del lactosuero difiere de unas madres a otras, pero en general se acepta que esta relación es de 40/60, frente a 80/20 en

las leches de vaca o cabra. Esta menor proporción de caseínas facilita la digestión y reduce el tiempo de vaciado gástrico, probablemente debido a la mayor digestibilidad de las proteínas séricas (Akrê J, 1994; Riordan J, 1998). Además hay estudios que indican que la mayor proporción de proteínas del lactosuero podría inducir una mayor colonización intestinal por bacterias probióticas (lactobacilos y bifidobacterias) (Balmer SE y col, 1989).

Componentes (por 100 ml)	Humana	Vaca	Cabra
Proteínas (g)	1,2	3,3	3,3
Caseína (g)	0,4	2,8	2,8
Lactoalbúmina (g)	0,3	0,4	0,4
Grasa (g)	3,8	3,7	4,1
Hidratos de carbono (g)	7	4,8	4,7
Lactosa (g)	6,3	4,8	4,7
Oligosacáridos (mg)	700	3	30
Minerales (g)	0,21	0,72	0,77
Calcio (mg)	32	120	126
Fósforo (mg)	15	92	97
Magnesio (mg)	4	11	13
Potasio (mg)	55	150	190
Sodio (mg)	20	45	38
Hierro (mg)	0,15	0,1	0,05
Cobre (mg)	0,04	0,03	0,04
Yodo (mg)	0,08	0,07	0,08
Manganeso (mg)	0,03	0,06	0,08
Zinc (mg)	0,3	0,38	0,34
Vitaminas			
Vitamina A (mg)	0,06	0,035	0,040
Vitamina D (µg)	0,055	0,08	0,06
Vitamina E (mg)	0,23	0,11	0,04
B1 Tiamina (mg)	0,02	0,04	0,05
B2 Riboflavina (mg)	0,035	0,17	0,14
B3 niacina (mg)	0,16	0,09	0,27
B5 Ácido pantoténico (mg)	0,18	0,34	0,31
B6 piridoxina (mg)	0,01	0,04	0,05
B9 Ácido fólico (µg)	5,2	5,3	1
B8 Biotina (µg)	0,7	2	2
B12 cobalamina (µg)	0,04	0,35	0,06
Vitamina C	4	1	1,3

Tabla 1-1. Principales componentes de la leche humana en comparación con las leches de vaca y cabra (adaptado de Riordan J y col, 1998).

Además, algunas proteínas presentes en el lactosuero ejercen determinados efectos biológicos y fisiológicos. Entre ellas se incluyen lactoferrina, inmunoglobulinas, lactoperoxidasa, glicomacropéptido y una gran variedad de factores de crecimiento.

La composición de aminoácidos de la leche materna está adecuada a las necesidades del recién nacido

La leche materna se caracteriza por una baja concentración de fenilalanina y tirosina, aminoácidos aromáticos que son difícilmente metabolizados por el niño, y que a altas concentraciones plasmáticas pueden ser perjudiciales. Otra importante característica es la presencia de taurina, que está ausente en la leche de vaca y de cabra y que es crucial para el desarrollo de la retina y para la estabilidad de las membranas celulares (Lawrence PB, 1994).

Además, la relación cisteína/metionina de la leche materna es próxima a 1, valor siete veces superior al de la leche de vaca (Lawrence PB, 1994). La transformación de metionina en cisteína está comprometida en el recién nacido, por la baja actividad del enzima cistationasa. De ahí que la mayor proporción de cisteína sea beneficiosa para el niño.

Finalmente, la leche materna contiene carnitina, que el recién nacido no puede sintetizar, pero que es vital durante las primeras etapas de desarrollo para la degradación de ácidos grasos de cadena larga (Lawrence PB, 1994).

La leche materna contiene péptidos con actividad biológica

Como consecuencia de la digestión de las proteínas, aparte de aminoácidos libres, se liberan péptidos, que son cadenas con diferente número de aminoácidos, que, además de su valor nutricional, tienen una importante actividad biológica regulando procesos fisiológicos.

Diferentes estudios sugieren que estos péptidos bioactivos pueden atravesar el epitelio intestinal y así llegar, a través de la circulación sistémica, a tejidos periféricos donde pueden ejercer su efecto (Robert PR, 1994).

En los últimos años se han aislado diferentes péptidos de la leche materna y también de la leche de vaca que participan en la regulación de diferentes funciones fisiológicas (tabla 1-2):

- Péptidos con efecto sobre el sistema digestivo: se han aislado péptidos con actividad opiácea, que se unen a receptores en el lumen intestinal y actúan como moduladores exógenos de la motilidad gastrointestinal, permeabilidad intestinal y liberación de hormonas intestinales. Entre ellos, los llamados α y β casomorfina, capaces de reducir la motilidad intestinal, por lo que se estudia su papel beneficioso en el tratamiento de la diarrea (Baró L y col, 2001).
- Péptidos con efectos inmunomoduladores y antimicrobianos: este otro grupo ejerce un papel protector sobre el organismo, ya sea potenciando el sistema inmune (encefalina) o ejerciendo una actividad antimicrobiana (isracina) (Baro L y col, 2001).
- Péptidos con efectos sobre el sistema cardiovascular: los principales efectos descritos en este campo son la actividad antihipertensiva (casokinina) y la actividad antitrombótica (casoplatelinas). La actividad antihipertensiva se debe a la inhibición de la enzima de conversión de la angiotensina (ACE) (Schlimme E y col, 1995), mientras que la actividad antitrombótica se produce como consecuencia de la similitud entre algunos péptidos y la cadena γ del fibrinógeno. Se establecería así una competencia por los receptores plaquetarios inhibiéndose la agregación plaquetaria (Jolles P y col, 1986). Aunque este tipo de péptidos se han aislado principalmente de leche de vaca, parece probable que puedan existir péptidos con actividades similares en la leche humana.

La lactoferrina es uno de los componentes proteicos más importantes de la leche materna

La lactoferrina constituye aproximadamente el 10-15% de la fracción proteica de la leche humana. Su actividad biológica reside en que es capaz de unirse a dos átomos de hierro férrico. Además, esta proteína posee la capacidad de resistir a la acción de las enzimas proteolíticas, especialmente en su forma saturada de hierro. De ahí que la lactoferrina se encuentre intacta en las deposiciones de lactantes alimentados al pecho (Brines RD y col, 1983) e incluso

en la orina de dichos lactantes, lo que prueba que no solo resiste la digestión sino que puede ser absorbida y excretada intacta (Hutchens TW y col, 1991).

Proteína	Péptidos bioactivos	Origen de la leche	Bioactividad descrita
Caseína a	α -casomorfina	Vaca	opiácea
	caseína- α -exorfina	Vaca	opiácea
	casokinina	Vaca	antihipertensiva
	β -casomorfina	Humana/Vaca	opiácea
Caseína b	casokinina	Vaca	inmunomoduladora/ antihipertensiva
	caseinfosfopéptido	Humana/Vaca	biodisponibilidad mineral
	caseinmacropéptido	Vaca	motricidad gastrointestinal y liberación de hormonas
Caseína k	casoxina	Humana	antagonista opiáceo
	casoplatelinas	Humana	anti trombótica
a-lactoalbúmina	fragmentos 50-53	Humana/Vaca	opiácea
b-lactoglobulina	β -lactorfinas	Vaca	opiácea/antihipertensiva
Lactoferrina	Lactoferrosina	Humana/Vaca	antagonista opiáceo
	Lactotransferrina	Humana/Vaca	antagonista opiáceo

Tabla 1-2: Principales péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis de las proteínas de leche humana y de vaca. (Adaptado de Baró L y col, 2001).

Debido a que una parte significativa del hierro de la leche materna va unida a la lactoferrina, se ha formulado la hipótesis de que esta proteína podría favorecer la absorción de hierro en los niños alimentados con leche materna. Así, se ha observado que los niños alimentados con leche materna, que contiene 0,2-0,4 mg/l de hierro, tienen un nivel de hierro a los seis meses de edad mejor que el de los alimentados con preparados para lactantes, a pesar de que estos preparados contenían mayor cantidad de hierro (0,7 mg/l) (Franson GB y col, 1980).

También ha sido ampliamente estudiado el papel de la lactoferrina como componente antimicrobiano. No está claro el mecanismo, pero podría deberse a su capacidad de secuestrar hierro e impedir la captación del mismo por bacterias, o bien a la producción de alteraciones en la membrana bacteriana perdiéndose la integridad de la misma (Nadiu y col, 1997). Incluso se ha postulado que la lactoferrina podría estimular la fagocitosis de monocitos y macrófagos.

En los últimos años ha cobrado interés la lactoferrina por su posible acción antiviral, que podría deberse a su capacidad de inhibir el proceso de adsorción de la partícula viral por parte de la célula. Esta actividad ha sido demostrada *in vitro*

con *Herpes simplex* (Marcheti E, 1998). Las actividades antimicrobiana y antiviral de la lactoferrina podrían estar implicadas en la mayor resistencia frente a infecciones gastrointestinales de los niños amamantados (Lonnerdal B, 1997).

Hormonas y factores de crecimiento presentes en la leche materna

Está claramente establecido que tanto el calostro como la leche humana madura contienen hormonas y factores de crecimiento (Baró L y col, 2001). Estos compuestos pueden llegar al epitelio intestinal y atravesarlo gracias a la menor actividad proteolítica y mayor permeabilidad intestinal del recién nacido. El interés en estos componentes proteicos radica en el importante papel que juegan en numerosos sistemas fisiológicos y en su ausencia casi general en los preparados para lactantes. Los factores de crecimiento más importantes de la leche materna están resumidos en la tabla 1-3.

Hormona/Factor de crecimiento	Funciones
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Regulación del desarrollo hepático e intestinal Traslocación bacteriana
Factor a transformador del crecimiento (TGF-a)	Continuidad y normal funcionamiento del epitelio intestinal
Factor b transformador del crecimiento (TGF-b)	Diferenciación del epitelio intestinal Carcinogénesis Producción de IgA Inducción de tolerancia oral
Factores de crecimiento insulínico I y II (IGF-I y II)	Proliferación y diferenciación celular
Hormona del crecimiento (GH)	Desarrollo y funcionamiento intestinal
Neuropéptidos	Incremento de la producción de IgA Estimulación de células T Producción de IL-12 por macrófagos

Tabla 1-3. Hormonas y factores de crecimiento más importantes de la leche humana. (Adaptado de Baró L y col, 2001).

1.2.2. Composición glucídica:

La lactosa es la mayor fuente de energía de la leche materna

La leche materna contiene una fracción glucídica del 7%, de la cual la lactosa es el componente mayoritario (6,3 g/dl). En las leches de vaca y cabra el contenido en carbohidratos y en lactosa es inferior (ver tabla 1-1), lo cual se debe a las mayores necesidades energéticas del recién nacido humano.

La lactosa es un componente con una importante función energética, ya que aporta la mayor parte de la energía proporcionada por la leche materna. Este disacárido es metabolizado por la lactasa dando lugar a glucosa y a galactosa, que es un monosacárido crucial para el desarrollo cerebral del recién nacido. De hecho, la mayor concentración de lactosa en la leche humana en comparación con la leche de otros mamíferos, podría estar relacionada con el mayor desarrollo cerebral del hombre (Riordan J, 1998). Además la lactosa facilita la absorción de calcio y favorece el crecimiento de una flora fecal protectora frente a bacterias patógenas.

Dentro de la fracción glucídica existen también oligosacáridos, glucolípidos y glucoproteínas con importantes funciones, sobre todo en la defensa frente a infecciones.

Los oligosacáridos: importantes compuestos bioactivos.

Los oligosacáridos constituyen el tercer componente mayoritario de la leche materna tras la lactosa y la grasa, con una concentración que oscila entre 0,7 y 1,2 g/100 ml. Además los oligosacáridos de la leche humana presentan una gran variabilidad, habiéndose descrito más de 100 estructuras diferentes. Esta es una de las principales diferencias de la leche humana frente a la de otros mamíferos, como por ejemplo la leche de vaca que sólo contiene trazas de oligosacáridos. La leche de cabra sí presenta un perfil de oligosacáridos más parecido al de la leche humana, con un contenido muy superior al de la leche de vaca (0,025-0,030 g/100 ml) y una variabilidad estructural no encontrada en otros mamíferos (Martínex-Férez A, 2004) (figura 1-1).

Los oligosacáridos de la leche materna son resistentes a la hidrólisis enzimática del tracto gastrointestinal, como se comprueba mediante digestiones

in vitro con preparaciones enzimáticas de páncreas humano y porcino y membranas intestinales (Engfer MB y col, 2000). Así mismo, existen estudios que demuestran que estos compuestos podrían atravesar el epitelio intestinal, pasando intactos a la circulación sistémica (Gnoth MJ y col, 2001).

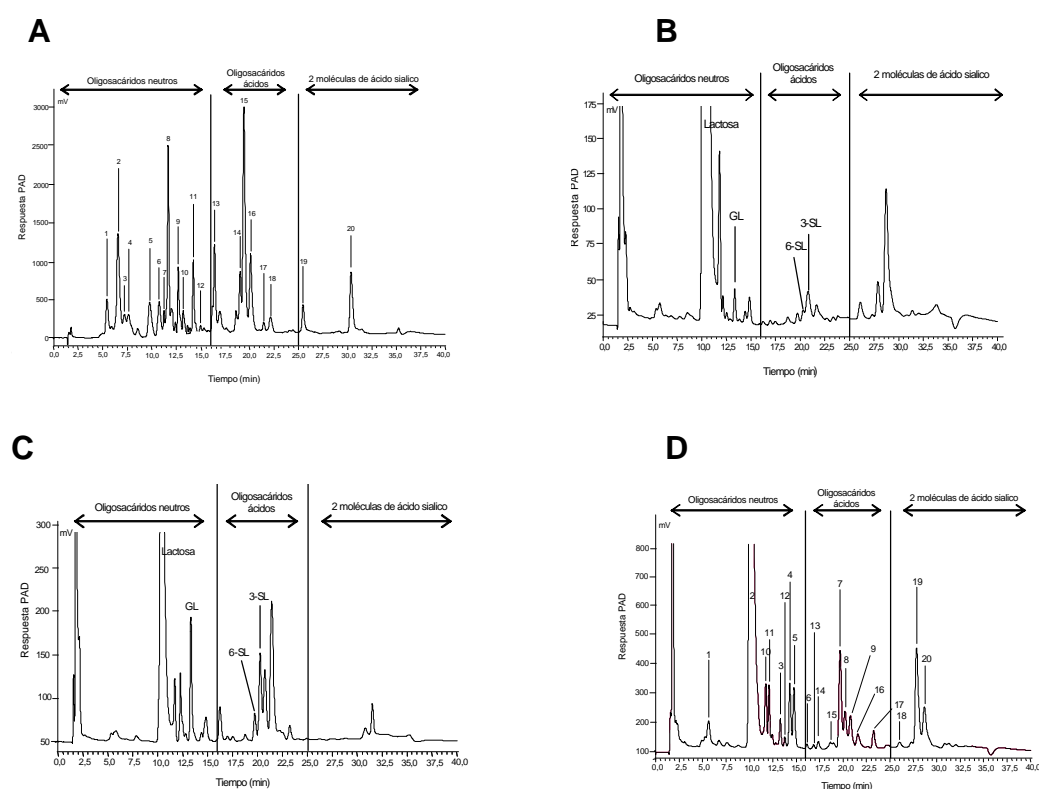


Figura 1-1. Perfil de oligosacáridos por HPAEC-PAD de las leches humana (A), ovina (B), bovina (C) y caprina D). (Martínez-Férez A, 2004).

Los oligosacáridos han cobrado un gran interés en los últimos años, debido a su papel como prebióticos, es decir, sustancias que favorecen el crecimiento de bacterias probióticas. Al no ser digeridos, estos compuestos actuarían como sustrato de la flora bifidogénica, contribuyendo a las diferencias en el pH y la flora fecal entre los niños amamantados y los alimentados con fórmulas (Mc Veagh P y col, 1997).

Actualmente ha cobrado también gran interés el posible papel de los oligosacáridos como receptores de patógenos. Al ser sintetizados por las mismas glicosiltransferasas que participan en la síntesis de glucolípidos y glucoproteínas de las células intestinales, los oligosacáridos presentan una similitud estructural con los carbohidratos de la superficie de las células intestinales (tabla 1-4). Así,

estos compuestos podrían actuar como receptores de microorganismos patógenos, constituyendo un mecanismo de defensa adicional para el recién nacido, cuyo sistema inmunológico no es todavía maduro. De hecho, los niños alimentados al pecho muestran menores tasas de diarrea, enfermedades respiratorias y otitis media (Kunz C y col, 2000; Newburg SN y col, 1995).

En base a todo esto, la suplementación de los preparados para lactantes con fibras y oligosacáridos es uno de los campos actuales de la investigación, ya que podría tener una gran influencia en la susceptibilidad del recién nacido frente a infecciones.

Receptores	Microorganismo
Glicoproteínas con manosa	<i>Escherichia coli</i> (tipo 1 Fimbrae)
Oligosacáridos fucosilados	<i>E.coli</i> (enterotoxina termorresistente)
Tetra y pentasacáridos fucosilados	<i>E.coli</i>
Sialil α (2-3) lactosa y glicoproteínas	<i>E.coli</i> (S-fimbriae)
Sialil α (2-3) galactósidos y mucinas	<i>E.coli</i> (S-fimbriae)
Oligosacáridos neutros	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Fuc (α 1-2) Gal epítomos	<i>Candida albicans</i>
Galb(1-4) GlcNAc o Gal β (1-3) GlcNAc	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sialil-lactosa	<i>Campylobacter pylori</i>
Sialil-lactosa	<i>Streptococcus sanguis</i>
Sialil-lactosa y glicoproteínas	<i>Campylobacter pylori</i>
Glicoproteínas sialiladas (α 2-3)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Poli-N-acetilactosaminas	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
α (2-3) poly-N-acetilactosaminoglicanos	<i>Streptococcus suis</i>
Sialil α (2-3)lactosa	Influenza virus A
Sialil α (2-3)lactosa	Influenza virus B
0-O-Ac de NeuAc α (2-3) Rad	Influenza virus C

Tabla 1-4. Oligosacáridos de la leche humana como receptores de microorganismos (Adaptado de Kunz C y col, 1993).

1.2.3. Composición lipídica:

La fracción lipídica supone el 3-4% de la leche humana y es el componente más variable, ya que depende en gran medida de la dieta consumida por la madre y del tiempo de lactancia. La grasa es la principal fuente de energía

para el recién nacido ya que cubre entre el 30 y el 50% de sus necesidades (Akre J y col, 1994).

Los componentes lipídicos de la leche humana incluyen triglicéridos, colesterol y fosfolípidos, además de ácidos grasos libres (tabla 1-5).

Lípidos totales (% en la leche)	3,8
Fosfolípidos	0,8
Mono-acilglicéridos	ND
Ácidos grasos libres	0,08
Colesterol	0,5
1,2-diacilgliéridos	0,01
1,3-diacilglicéridos	ND
Triacilglicéridos	98,3
Ésteres de colesterol	ND

Tabla 1-5. Composición porcentual de los lípidos de la leche humana. (Adaptado de Bitman y col, 1983) (ND: no detectable).

La leche humana tiene un alto contenido en colesterol

La leche humana contiene 30-40 mg/dl de colesterol. Este valor es el doble que el de la leche de vaca o de cabra que oscila entre 10 y 15 mg/dl.

El colesterol es necesario principalmente para el desarrollo cerebral del recién nacido (Akrê J y col, 1994). Sin embargo no se ha demostrado que un nivel elevado de colesterol sérico en el niño tenga ventaja alguna. Diversos estudios han evidenciado que el cerebro puede sintetizar sus propios requerimientos de colesterol, así como pueden hacerlo otros órganos que también lo requieren (Gould RG, 1958). Además existen estudios que sugieren que unos elevados niveles de colesterol sérico, en etapas tempranas de la vida, no constituyen un requisito previo al desarrollo de una homeostasis adecuada de colesterol en el hombre (Friedman G y col, 1975).

Con estos datos, según la ESPGAN (Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica) no existen razones suficientes para recomendar una suplementación de colesterol en las fórmulas para lactantes.

La estructura de los triglicéridos de la leche humana favorece la absorción de la grasa por el lactante

Los triglicéridos constituyen el 98% de la grasa de la leche humana. La digestión de los triglicéridos en el lactante, se lleva a cabo gracias a la acción de diferentes lipasas: lingual, gástrica, pancreática y sobre todo, la lipasa intestinal, estimulada por las sales biliares en el duodeno.

Hay estudios que indican que, a pesar de la reducida actividad de la lipasa pancreática durante las primeras semanas de vida, la reacción limitante de la digestión de la grasa no es la hidrólisis de triglicéridos, sino la solubilización de los ácidos grasos saturados de larga cadena (Watkins y col, 1975). En consecuencia, la absorción de grasas es mejor cuando los triglicéridos tienen ácidos grasos saturados, principalmente palmítico (16:0), en la posición interna del triglicérido. Esto se debe a que las lipasas hidrolizan principalmente las posiciones externas y el ácido graso de la posición 2 se absorbe como 2-monoglicérido y no como ácido graso libre. Esta es la principal razón por la que la grasa de la leche humana se absorbe mejor que la procedente de la leche de vaca. En la leche humana el 75% del palmítico se encuentra en la posición 2 del triglicérido (figura 1-2), mientras que en la de vaca el ácido palmítico se encuentra distribuido al azar en las tres posiciones (Dotson y col, 1992).

La leche humana como fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL)

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga se han considerado como esenciales para el lactante, debido a la inmadurez de las enzimas desaturasas y elongasas que se encargan de su síntesis a partir de los ácidos grasos esenciales. Los AGPI-CL juegan un papel clave en el desarrollo del cerebro y de la retina del recién nacido (Hamosh M y col, 1998).

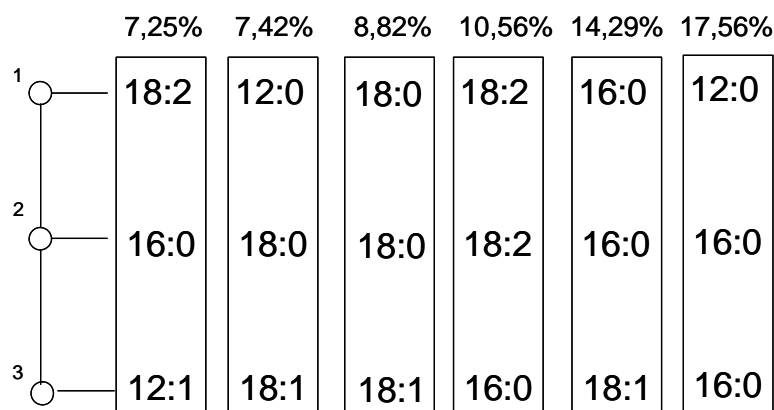


Figura 1-2: Triglicéridos más frecuentes en la leche materna (% respecto al total). (Adaptado de Dotson y col, 1992).

La leche materna aporta principalmente ácido araquidónico (AA, 0,44g/100g de grasa) y ácido docosahexaenoico (DHA, 0,30g/100g de grasa). Estos ácidos grasos no son esenciales para el adulto que puede sintetizarlos a partir de ácido linoleico (LA) y α -linolénico (ALA) presentes normalmente en la dieta. Sin embargo, como ya se ha comentado, el lactante tiene esta capacidad reducida y de ahí la importancia del aporte de estos AGPI-CL por la leche materna (Koletzko B et al, 1999).

Hay estudios que sugieren una mejor función visual y cognitiva en niños amamantados comparados con niños alimentados con fórmulas para lactantes (Uauy R et al, 2000).

1.2.4. Minerales:

La concentración de minerales de la leche humana es aproximadamente la tercera parte de la que contiene la leche de vaca o de cabra. Esto, junto con el menor contenido en proteínas, lleva a una menor osmolaridad, lo cual es adecuado para la función renal del lactante.

El contenido total de minerales de la leche humana es constante e incluye: sodio, potasio, cloro, calcio, magnesio y fósforo, así como trazas de hierro, zinc, cobre, manganeso, selenio y yodo.

Varios estudios han demostrado la alta biodisponibilidad de los minerales de la leche materna y su relación con otros componentes que facilitan su absorción, metabolismo y excreción (Picciano MF y col, 1998). La alta biodisponibilidad compensa la baja concentración de ciertos minerales como el

calcio y el zinc, cuyo contenido en leche materna, a pesar de ser bajo, satisface las necesidades de los niños nacidos a término.

Otro ejemplo es el hierro, ya que a pesar de que su contenido es también bajo en la leche humana, no suelen producirse deficiencias en el lactante, debido principalmente a su mayor absorción facilitada por la presencia de la vitamina C, así como por los bajos niveles de proteínas y de fósforo.

1.2.5. Vitaminas:

Todas las vitaminas solubles están presentes en la leche humana, principalmente la vitamina C, cuya concentración dobla la de la leche de vaca y cabra. A pesar de ello, se han descrito algunas deficiencias de vitamina B12 en lactantes de madres vegetarianas (Rodríguez-Palermo M y col, 1999).

En cuanto a las vitaminas liposolubles, el contenido en vitaminas A y E es adecuado en la leche humana. Sin embargo, pueden producirse deficiencias de vitamina K, sobre todo en los primeros días tras el nacimiento, durante los cuales la producción endógena por bacterias entéricas es muy baja. También es baja la concentración de vitamina D, lo que podría suponer un problema debido a la escasa exposición solar de los lactantes.

1.2.6. Nucleótidos:

Los nucleótidos y sus metabolitos desempeñan un papel clave en numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos, tales como procesos de transferencia de energía o la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos. Los nucleótidos pueden ser sintetizados endógenamente, sin embargo, pueden llegar a ser semiesenciales en determinadas situaciones en las que esta síntesis es insuficiente para cubrir las necesidades, como ocurre en la etapa de crecimiento rápido del recién nacido.

El perfil de nucleótidos de la leche humana es marcadamente diferente al de las leches de otros mamíferos y al de las fórmulas infantiles. Así, la fracción nitrogenada no proteica de la leche humana, a la cual pertenecen los nucleótidos, supone entre el 18-30% del nitrógeno total, mientras que en la leche de vaca sólo constituye el 5% (Baró L y col, 2001).

En los últimos años se han desarrollado numerosos trabajos que sugieren diferentes efectos de los nucleótidos, que se podrían resumir en los siguientes apartados:

- Modulación de la respuesta inmunológica: en lactantes la presencia de nucleótidos en la dieta parece inducir un aumento de la actividad *Natural Killer* (NK) y de la producción de IL-2 (Carver JD, 1996). Además las fórmulas infantiles con nucleótidos han demostrado potenciar la respuesta del recién nacido frente a las vacunas de la difteria y de *H.influenzae* tipo b (Pickering LK y col, 1998).

- Tracto gastrointestinal: los nucleótidos parecen favorecer el desarrollo normal del epitelio intestinal. Así, experimentos *in vivo* muestran un aumento de la altura de las criptas y una mayor actividad disacaridasa en ratas destetadas que recibieron una dieta suplementada en nucleótidos (Uauy R y col, 1990).

- Funcionamiento hepático: la administración exógena de nucleótidos parece mejorar la función hepática y la capacidad de regeneración del hígado en modelos animales de experimentación (Carver JD, 1996).

- Metabolismo lipídico: los nucleótidos provocan un aumento de las concentraciones plasmáticas y eritrocitarias de AGPI-CL en recién nacidos (Gil A y col, 1986).

1.2.7. Poliaminas:

Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) son un grupo de compuestos nitrogenados presentes en tejidos animales, bacterias y virus. Están presentes en la leche humana en cantidades importantes, pero su papel en la nutrición del neonato no está del todo establecido.

Estos compuestos son buenos marcadores del desarrollo y proliferación intestinal y existen estudios que sugieren un efecto trófico directo sobre las células intestinales inmaduras, mejorando la permeabilidad de la mucosa (Buts JP y col, 1993).

Otro papel importante de las poliaminas de la leche materna es su posible efecto preventivo de las alergias alimentarias. Al favorecer la maduración de los enterocitos, estos compuestos mejoran la permeabilidad intestinal, lo cual implica un menor paso de alérgenos alimentarios. Así, la probabilidad de desarrollar alergia alimentaria por el niño puede llegar al 80% si la concentración media de espermina en leche es menor de 2 nmol/ml. Sin embargo dicha probabilidad es muy baja si la concentración de la misma es mayor de 13 nmol/ml (Dandriofosse G y col, 2000).

1.2.8. Microbiota de la leche humana:

Desde hace tiempo se sabe que la flora bacteriana de niños amamantados es diferente de la de niños alimentados con fórmula (Balmer SE y col, 1989). Lactobacilos y bifidobacterias predominan en los primeros, mientras que enterobacterias como *E.coli*, bacteroides y estafilococos dominan la flora de los segundos (figura 1-3).

Determinados componentes de la leche humana, como oligosacáridos y algunas proteínas del lactosuero son responsables del establecimiento de esta flora, ya que favorecen el crecimiento de bacterias saludables al provocar un descenso del pH intestinal, poco favorable para el crecimiento de bacterias patógenas. Sin embargo, hasta hace poco tiempo la leche humana se consideraba estéril, ya que no había evidencias de que contuviera bacterias. Estudios recientes demuestran que determinadas bacterias ácido-lácticas (BAL) forman parte de la composición de la leche humana, lo cual contribuiría a la flora intestinal favorable que se observa en niños amamantados (Martín R y col, 2003; Martín R y col, 2004).

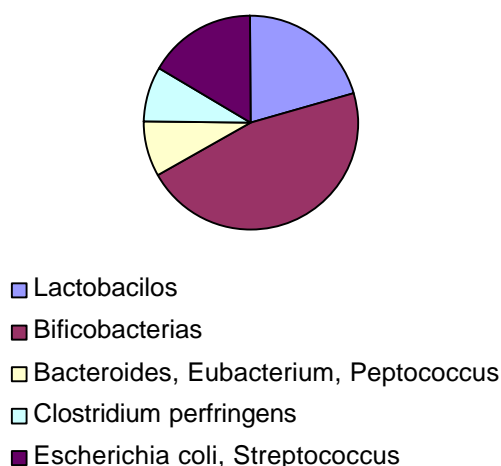


Figura 1-3. Principales bacterias de la flora intestinal del lactante amamantado.

1.3. Principales beneficios de la lactancia materna

Como se ha descrito en el apartado anterior, la leche humana no sólo aporta al recién nacido los nutrientes que necesita para su correcto desarrollo, sino que además aporta una serie de componentes bioactivos que confieren a la lactancia importantes ventajas.

Así, la leche humana tiene componentes que le confieren efectos antiinfecciosos, antiinflamatorios e inmunomoduladores, que le permiten proteger al lactante de diversas patologías.

1.3.1. La leche humana confiere protección frente a infecciones gastrointestinales y respiratorias:

Una de las principales causas de muerte en la edad infantil son las enfermedades infecciosas, dentro de las cuales, las infecciones respiratorias y gastrointestinales son las más frecuentes.

Los niños que no han sido alimentados con leche materna tienen una probabilidad 17 veces mayor de ser hospitalizados por neumonía que aquellos que han sido amamantados. Esta probabilidad es aún mayor para niños de menos de 3 meses (César JA y col, 1999). También existen estudios que sugieren que el riesgo de muerte por diarrea aumenta 14,2 veces en niños no amamantados (Victoria CG y col, 1987). Así mismo, la lactancia materna ha sido relacionada con una menor incidencia de otitis media, infecciones urinarias y meningitis causada por *Haemophilus influenzae* (Nascimento MBR y col, 2003).

Los componentes inmunológicos de la leche materna como responsables de la actividad antiinfecciosa

La composición inmunológica de la leche materna es en gran medida responsable de su papel antiinfeccioso. Dichos componentes inmunológicos pueden dividirse en celulares y humorales, pudiendo ser a su vez específicos y no específicos (figura 1-4).

Los elementos celulares están constituidos principalmente por leucocitos vivos, presentes en alto número en las primeras etapas de la lactancia. Dentro de ellos se incluyen:

- macrófagos y polimorfonucleares: son componentes celulares no específicos y los más abundantes en la leche humana (80-90%). Tienen capacidad fagocítica, lo que les confiere propiedades bactericidas y fungicidas. Además los macrófagos sintetizan algunos de los componentes humorales, como moléculas del complemento C3 y C4, lisozima y lactoferrina (Xanthou M y col, 1998).
- linfocitos: representan entre 5-10% del total de glóbulos blancos (Riordan J y col, 1998). Se encuentran principalmente linfocitos T, con una actividad citotóxica frente a microorganismos. En menor número existen linfocitos B, responsables de la síntesis de anticuerpos específicos frente a numerosos patógenos.

Sobre los elementos de defensa humorales no específicos ya se ha hablado en el apartado anterior: lactoferrina, oligosacáridos, nucleótidos y otros componentes con actividad protectora frente a infecciones.

Dentro de los elementos humorales específicos de la leche humana se encuentran citoquinas, factores de crecimiento, pero principalmente, las inmunoglobulinas (Ig). Cualquier patógeno que amenaza a la madre estimula la producción de estos anticuerpos específicos, que son secretados a la leche humana, y a través de ella llegan al recién nacido, protegiéndolo de microorganismos patógenos.

La principal Ig de la leche humana es la IgA, que representa el 10% del total de proteínas. La IgA previene la adhesión de microorganismos a la pared intestinal del lactante, además de actuar frente a diversos agentes infecciosos como: rotavirus, *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium difficile*, *Giardia lamblia* y *Campylobacter* (do Nascimento MBR y col, 2003).

Existen otras Ig presentes en la leche humana como la IgD que participa en la respuesta inmune a nivel de la glándula mamaria o la IgE que favorece la liberación de mediadores químicos que aumentan la permeabilidad intestinal, facilitando la liberación de IgG con actividad opsonizadora sobre bacterias y virus. Finalmente se encuentra la IgM, importante para la protección inicial del neonato frente a las infecciones maternas.

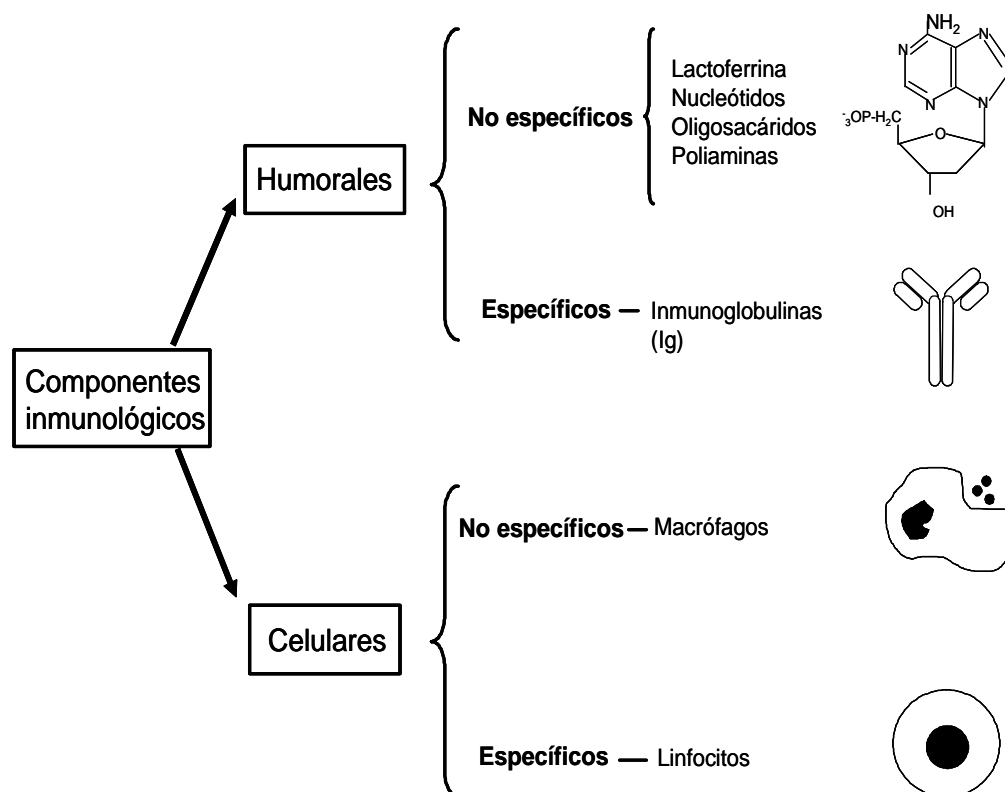


Figura 1-4. Componentes inmunológicos de la leche humana.

La leche humana favorece una flora intestinal protectora

Los niños amamantados tienen una flora intestinal más favorable que los niños alimentados con fórmula, tanto por la presencia de bacterias ácido-lácticas en la leche materna, como por diferentes compuestos que favorecen el crecimiento de estas bacterias. Esta flora juega un papel clave en la protección que confiere la leche materna frente a infecciones. Así, diferentes estudios muestran que lactobacilos y bifidobacterias ejercen un efecto antagonista del crecimiento de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens* (Gilliland SE y col, 1977; Ozbas ZY y col, 1995).

Dichas bacterias colonizan la mucosa intestinal del lactante de forma competitiva, impidiendo la adhesión de patógenos gastrointestinales. Así mismo, se establece una competencia por los nutrientes que impide el crecimiento de estos patógenos (Conway PI, 1996).

Otro mecanismo antimicrobiano de las bacterias ácido-lácticas es la producción de determinadas sustancias que dificultan el crecimiento de otros microorganismos perjudiciales (Laroya S y col, 1990) :

- ácidos orgánicos: como el ácido láctico o el acético, que disminuyen el pH y favorecen el peristaltismo creando un ambiente desfavorable para los patógenos.
- peróxido de hidrogeno: que oxida el tiocianato dando ácido hidrocianico, también perjudicial para estos microorganismos.
- bacteriocinas (nisina, lactobrevina, acidofilina, acidolina, etc.): sustancias con una actividad antimicrobiana específica.

1.3.2. La leche humana modula la respuesta inmunológica del lactante:

Además de la actividad antiinfecciosa, recientes estudios han demostrado que la leche materna puede modular la respuesta inmunológica del lactante, a través de componentes inmunomoduladores y antiinflamatorios entre los que destacan prolactina, lactoferrina, nucleótidos y citoquinas (Grazioso y col, 1997). Estos componentes tienen la capacidad de regular la maduración del sistema inmunológico del lactante, favoreciendo la proliferación de linfocitos, la síntesis de inmunoglobulinas y la actividad celular.

En la actualidad no se ha demostrado *in vivo* una actividad antiinflamatoria directa de la leche humana, pero estudios epidemiológicos sugieren que los niños amamantados están protegidos frente a infecciones, sin la observación de lesiones de la mucosa intestinal o respiratoria debidas a una respuesta inflamatoria (Garofalo RP y col, 1999). Probablemente, este es el resultado de un sistema antiinflamatorio muy bien regulado de la leche humana.

Los factores antiinflamatorios incluyen proteasas, interleuquinas, prostaglandinas, acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, IgA secretora y antioxidantes como vitaminas y peroxidasas. Las hormonas y factores de crecimiento también juegan un papel clave en este sentido, promoviendo la maduración intestinal y el desarrollo del sistema inmunológico del lactante (Garofalo RP y col, 1999).

La flora intestinal y el equilibrio del sistema inmunológico

La homeostasis del sistema inmunológico depende del equilibrio entre dos tipos de respuestas linfocitarias: T_H1 , T_H2 (ver apartado 4.1.1). En el recién nacido este equilibrio está desplazado hacia T_H2 y el contacto con bacterias, entre ellas las que colonizan el intestino del neonato, compensa este desequilibrio. Sin embargo, las condiciones higiénicas que se aplican sobre todo en los países occidentales, retrasan el contacto del lactante con bacterias, lo que supone mantener este desequilibrio hacia T_H2 , favoreciendo la aparición de alergias.

Las bacterias probióticas estimulan la respuesta T_H1 , compensando el desequilibrio comentado anteriormente y disminuyendo el riesgo de posibles alergias. Así, la suplementación de la dieta de la madre y del lactante con probióticos durante los 6 primeros meses postnatales, produjo una reducción del 50% en la incidencia de eczema atópico (Kalliomäki M y col, 2001). Esto podría deberse, entre otras cosas, a que los lactobacilos estimulan la producción de citoquinas T_H1 , como la IL-12 por los linfocitos humanos.

La leche humana y la respuesta a vacunas

La acción de la leche materna sobre el sistema inmunológico del lactante también podría explicar la mejor respuesta de éste frente a determinadas vacunas. Así, diferentes estudios encuentran una mayor producción de anticuerpos en niños amamantados y vacunados frente a la poliomielitis, tétanos y difteria (Hahn-Zoric M y col, 1990). Como ya se ha comentado, esta estimulación de la respuesta frente a vacunas podría deberse a la presencia de nucleótidos en la leche materna (Pickering LK y col, 1998).

1.3.3. Beneficios para la madre:

La lactancia materna, además de los beneficios para el lactante, tiene también numerosos efectos beneficiosos para la salud de la madre. Así, la lactancia favorece la adecuada involución del útero y disminuye las hemorragias post-parto protegiendo las reservas de hierro, lo que conduce a menores porcentajes de anemia en las madres de niños amamantados (Almeida JA, 1999).

Se cree que la lactancia induce una rápida pérdida de peso en la madre, especialmente durante el primer mes post-parto y persiste, aunque en menor medida, hasta el destete (Nascimento MBR y col, 2003).

Además, hay diversos estudios que relacionan la lactancia con una menor incidencia de determinadas patologías como osteoporosis, o cáncer de mama y de ovario (Byers T y col, 1985; Kritz-Silverstein D y col, 1992).

1.3.4. Beneficios económicos:

La lactancia materna tiene un importante impacto social, sobre todo en los países en desarrollo, donde el uso de leche humana como una fuente nutricional es crucial por su valor económico. La alimentación con leche materna conduce a un importante ahorro para la familia, ya que no es necesario gastar dinero en fórmulas sustitutivas.

Pero además, el beneficio económico repercute en el sistema sanitario, ya que los beneficios de la leche humana para la salud del lactante, hacen que por cada niño no amamantado haya visitas adicionales al pediatra y prescripciones para tratamientos de diarrea, otitis e infecciones respiratorias.

En resumen, la lactancia es el método ideal para la alimentación del recién nacido y la mayoría de los pediatras recomiendan que la leche humana sea el alimento exclusivo del neonato, durante los seis primeros meses de vida.

Como Colette Clark dijo:

“El recién nacido tiene sólo tres necesidades esenciales: el calor humano de los brazos de la madre, la certeza de la presencia de la madre y la leche de sus pechos. La lactancia satisface las tres”.

2. LA LACTANCIA ARTIFICIAL COMO ALTERNATIVA A LA LECHE HUMANA.

La lactancia materna es aconsejable durante al menos los seis primeros meses de vida. Sin embargo, en algunas ocasiones, la lactancia materna no es posible, deseable o suficiente, y en estos casos es necesario recurrir a lo que se denomina lactancia artificial, es decir, alimentación del lactante con una leche diferente a la humana, generalmente mediante las llamadas fórmulas infantiles.

La denominación “fórmula infantil” hace referencia a todos los productos destinados a la alimentación del lactante, que pueden sustituir de forma total o parcial a la leche materna. Estas fórmulas han sido diseñadas para proporcionar al neonato los nutrientes requeridos para su correcto crecimiento y desarrollo. Además, las fórmulas infantiles son cada vez más parecidas a la leche humana, y el reto que se plantea en nutrición infantil no es sólo cubrir las necesidades del recién nacido, sino también imitar las propiedades funcionales de la leche materna.

2.1. Requisitos legales de las fórmulas infantiles

Los productos alimenticios infantiles están regulados legislativamente como aquellos destinados a una alimentación especial, también conocidos como dietéticos, y que se definen como los que, por su composición particular o por el proceso de su fabricación, se distinguen claramente de los productos alimenticios de consumo corriente. Estos productos son apropiados para un objetivo nutritivo indicado y se comercializan indicando que responden a dicho objetivo.

Para la elaboración de la legislación alimentaria, comités de expertos (*European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*. ESPGHAN) redactan recomendaciones sobre alimentación infantil, tanto en referencia a leches de inicio como de continuación. Estas recomendaciones de la ESPGHAN, son tenidas en cuenta por la Unión Europea que redacta Directivas Europeas con aplicación en todo el ámbito de la unión. Finalmente, las Directivas Europeas son analizadas por los comités de expertos de cada país, y en función de ellas se modifican las legislaciones alimentarias. En España esta modificación se realiza a través de Reales Decretos (RD).

2.1.1. Definición de una fórmula infantil:

Según el *Codex Alimentarius* para que un preparado reciba el nombre de fórmula infantil debe cumplir una serie de requisitos:

- a) una fórmula infantil en forma líquida debe ser usada bien directamente o bien previamente diluida en agua potable y hervida. En forma sólida requiere, igualmente, agua potable y hervida para su preparación.
- b) una fórmula infantil debe ser nutricionalmente adecuada para promover el normal crecimiento y desarrollo del niño y satisfacer, por sí sola, sus requerimientos nutricionales. En función de dichos requerimientos se distinguen dos tipos de fórmulas infantiles:

Fórmulas de inicio: son las que tienen como finalidad satisfacer por sí solas todos los requerimientos nutricionales del lactante durante los primeros 4-6 meses de vida, aunque pueden ser utilizadas – junto con otros alimentos infantiles – hasta la edad de un año.

Fórmulas de continuación: son las que forman parte de un régimen de alimentación mixto, destinadas a ser utilizadas a partir de los 4-6 meses de edad.

- c) una fórmula infantil debe ser procesada por medios físicos y empaquetada de manera que se prevenga su contaminación bajo condiciones normales de uso, manejo, almacenamiento y distribución en el país donde es vendida.

Las fórmulas infantiles (de inicio o de continuación) deben ser productos basados en la leche de vaca o de otros animales y/o otros constituyentes comestibles de origen animal o vegetal que hayan probado ser adecuados para la alimentación infantil (*Codex Alimentarius*, 2001).

2.1.2. Características de las fórmulas de inicio:

Las fórmulas de inicio deben ser diseñadas de manera que se parezcan lo máximo posible a la leche materna y deben cumplir una serie de requisitos en cuanto a su composición:

- No contener ni almidón ni harina.
- No deben estar acidificadas, ni incluir otras sustancias tales como la miel.
- La fórmula debe ser isotónica con el fin de minimizar el desplazamiento de agua entre los distintos compartimentos corporales.
- Como hidratos de carbono se dará preferencia a los disacáridos u oligosacáridos sobre los monosacáridos, para proporcionar energía sin aumentar la osmolaridad de la fórmula.
- Los lípidos deben aportar el 50% de la energía.

La tabla 2-1 resume los requerimientos máximos y mínimos de las fórmulas infantiles. A continuación se comentan algunos de estos requerimientos referentes a los macro- y micronutrientes.

Contenido energético

Debe oscilar entre 64-72 kcal/100 ml, recomendación que está basada en el contenido medio de energía de la leche humana. Las fórmulas con alto contenido energético, no son recomendables ya que al tener una elevada osmolaridad, pueden aumentar la sed del lactante e inducir una sobre-alimentación.

	Fórmulas de inicio por 100 kcal	Fórmulas de continuación por 100 kcal
Energía	64-72 kcal/100 ml	60-85 kcal/100 ml
Proteínas leche de vaca proteínas de soja	1,8 - 2,8 2,25 - 3,0	3,0-5,5 -
Lípidos (g) Ácido linoleico (AL) (mg) Ácido alfa-linolénico (AAL) (mg) Proporción AL-AAL n-3 AGPI-CL n-3 AGPI-CL Ácido araquidónico (AA)	4,0 - 6,0 1200-300 50 (mínimo) may-15 1% del total de grasa (máximo) 2% del total de grasa (máximo) 1% del total de grasa (máximo)	3,0-6,0 300 (mínimo) - - -
Hidratos de carbono (g) Lactosa (g) Sacarosa Almidón precocinado y gelatinizado	8,0 -12,0 3,5 (mínimo) 20% del total de carbohidratos (máximo) 2% y 30% del total de carbohidratos (máximo)	8,0 -12,0 0,45 (mínimo) 20% del total de carbohidratos (máximo) 2% y 30% del total de carbohidratos (máximo)
Minerales (mg) Sodio Potasio Cloro Calcio Fósforo Magnesio Hierro Zinc Cobre Yodo Selenio	20-60 60-145 50-125 50 (mínimo) 25-90 5-15 0,5-1,5 0,5-1,5 20-80 5 (mínimo) 3 (máximo)	35-120 78-200 60-150 90 (mínimo) 60 (mínimo) 6 (mínimo) 1,0-2,0 0,5 (mínimo) - 0,005 (mínimo) -
Vitaminas A (UI) D (UI) C (8g) B1 Tiamina (ug) B2 Riboflavina (ug) B3 Niacina (ug) B5 Ácido pantoténico (ug) B6 piridoxina (ug) B8 Biotina (ug) B9 Ácido fólico (ug) B12 cobalamina (ug) Vitamina E (ug) Vitamina K (ug)	250-500 40-80 8 (mínimo) 40 (mínimo) 60 (mínimo) 250 (mínimo) 300 (mínimo) 35 (mínimo) 1,5 (mínimo) 4 (mínimo) 0,15 (mínimo) 0,5 mg de alpha tocoferol/g de AL nunca menos de 0,7mg/100 kcal 4 (mínimo)	250-500 40-80 - - - - - - - - - 0,5 mg de alpha tocoferol/g de AL nunca menos de 0,5mg/100 kcal -

Tabla 2-1. Recomendaciones de la ESPGHAN para la composición de fórmulas infantiles. (Adaptado de Alles-Martine S y col, 2004 y Riviero M y col, 2003).

Proteínas (1.8-2.8 g/100 kcal ó 1.2-1.9 g/100 ml)

Las únicas fuentes de proteínas para nutrición infantil que actualmente son admitidas por la Unión Europea son la leche de vaca y la soja, ya que son las únicas sobre las que existen estudios clínicos suficientes que avalen su seguridad

y adecuación. En el caso de utilizar proteínas de soja (fórmulas especiales) el valor nutritivo de la proteína no debe ser inferior al 85% del valor de la caseína.

Esto no quiere decir que otras fuentes estén prohibidas explícitamente, sino que hasta que no haya estudios que avalen su utilización en nutrición infantil, estas otras fuentes no son admitidas.

Además se han formulado unos requerimientos en aminoácidos esenciales y semiesenciales que están basados en la composición de la leche humana (tabla 2-2).

	Por 100 kJ	Por 100 kcal
Arginina	16	69
Cisteína	6	24
Histidina	11	45
Isoleucina	17	72
Leucina	37	156
Lisina	29	122
Metionina	7	29
Fenilalanina	15	62
Treonina	19	80
Triptófano	7	30
Tirosina	14	59
Valina	19	80

Tabla 2-2: Aminoácidos esenciales y semiesenciales de la leche materna (adaptado de RD 72/1998).

Lípidos (4.0-6.0 g/ 100 kcal ó 2.7-4.1 g/100 ml)

No hay evidencias científicas de que la utilización de grasas de origen vegetal sólo, sea mejor que la mezcla de grasas de origen animal y vegetal. La disponibilidad de la grasa en alimentación infantil depende más de su composición química que de su origen animal o vegetal (Riviero M y col, 2003).

En función de la composición de ácidos grasos presentes en la grasa de la leche materna se han formulado unos requerimientos máximos para determinados ácidos grasos (tabla 2-3). Según la legislación europea actual, sólo hay requerimientos mínimos para los ácidos linoleico (LA 18:2 n-6) y α -linolénico (ALA 18:2 n-3), ya que el organismo humano no puede sintetizarlos y son los precursores de otros ácidos grasos importantes para el recién nacido, como el

ácido araquidónico (AA-20:4 n-6) y el docosahexaenoico (DHA-22:6 n-3) respectivamente.

	Requerimientos	
	Máximo (mg/100kcal)	Mínimo (mg/100kcal)
Ac. Láurico	975	-
Ac.Mirístico	975	-
Ac. Linoleico	1200	300
Ac.a-linolénico	50	-
Ac.Erúcico	65	-

Tabla 2-3. Requerimientos de ácidos grasos en fórmulas de inicio (RD 72/1998).

Se pueden añadir ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) (20 y 22 átomos de carbono). En tal caso, su contenido no será superior a: 1% del contenido total de materia grasa para los AGPI-CL de la serie n-3, y 2% para los AGPI-CL de la serie n-6 (1% para el ácido araquidónico). El DHA es importante para el desarrollo cerebral y cognitivo del recién nacido, y aunque puede ser sintetizado a partir de α -linolénico, esta capacidad puede estar reducida en el neonato (Alles-Martine S y col 2004) y en especial en niños pretérmino (Saverwald TU y col, 1997). A partir de ALA se sintetiza el ácido eicosapentaenoico (EPA 20:5 n-6) que a su vez es convertido enzimáticamente en DHA, aunque por la inmadurez de las enzimas del recién nacido, se recomienda que el contenido en EPA no supere el de DHA.

Hidratos de carbono (8-12 g/100 kcal ó 5.4-8.2 g/100 ml)

La lactosa debe ser el principal hidrato de carbono. El resto será preferiblemente glucosa y/o dextrinomaltosa. La leche humana contiene 7g/100ml de hidratos de carbono, siendo el 90% lactosa y el resto oligosacáridos. No contiene fructosa, ni sacarosa.

Componentes minoritarios

Debido a que la leche de vaca, que normalmente se utiliza en la elaboración de las fórmulas infantiles, tiene una composición vitamínica y mineral diferente a la leche humana (ver tabla 1-1), la legislación contempla unos límites

máximos y mínimos en función del tipo de preparado, y siempre tomando como referencia la leche humana (tabla 2-1). Así, por ejemplo se contempla la posibilidad de añadir hierro, principalmente debido a que la concentración de lactoferrina en estos preparados es inferior a la de la leche humana (RD 72/1998).

Debido a los demostrados efectos beneficiosos de los nucleótidos y su presencia en la leche humana (ver apartado 1.2.6), la legislación contempla la posibilidad de añadirlos en las fórmulas infantiles (tabla 2-4) (RD 72/1998).

Nucleótidos	mg/100 kcal
Total	5
Citidina-5-monofosfato	2,5
Uridina-5-monofosfato	1,75
Adenosina-5-monofosfato	1,5
Guanosina-5-monofosfato	0,5
Inosina-5-monofosfato	1

Tabla 2-4. Recomendaciones máximas sobre la adición de nucleótidos a fórmulas de inicio. (Adaptado de Alles-Martine S y col, 2004)

2.1.3. Características de las fórmulas de continuación:

Los requerimientos legales para las fórmulas de continuación no son tan estrictos como los que se establecen para las fórmulas de inicio. En primer lugar, porque normalmente forman parte de un régimen mixto de alimentación, que podría compensar las posibles carencias de la alimentación exclusiva con estas fórmulas. Además están destinadas a niños a partir de 4-6 meses, y a esta edad el niño presenta una mayor capacidad metabólica que el recién nacido.

No obstante, estas fórmulas se rigen por una legislación similar a la de las fórmulas de inicio, y los comités de expertos formulan una serie de recomendaciones en función de la edad del niño, que están recogidas en la tabla 2-1.

Energía

Debe oscilar entre 60-85 kcal/100ml, aunque a partir de las 6 semanas de vida, los lactantes son capaces de regular su consumo de alimentos de un modo más o menos independiente de la densidad energética de éstos (Riviero M y col, 2003).

Proteínas (3,0-5,5 g/100 kcal ó 2,0-3,7 g/100 ml)

Como en las fórmulas de inicio, las fuentes de proteína actualmente autorizadas por la legislación europea son la leche de vaca y la soja. De nuevo, en el caso de utilizar proteínas de origen vegetal, el valor nutritivo de la proteína no debe ser inferior al 85% del valor de la caseína.

Lípidos (3,0-6,0 g/ 100 kcal ó 20-3,7 g/100 ml)

No existe razón científica para sustituir totalmente la grasa de la leche de vaca por grasa vegetal. Tampoco se justifica la suplementación sistemática con ácidos grasos esenciales en estas fórmulas. Aunque para los preparados que contengan aceites vegetales se establece un contenido mínimo de ácido linoleico de 300 mg/ 100 Kcal, por las mismas razones que se comentaron en las fórmulas de inicio (RD 72/1998).

Hidratos de carbono (8-12 g/100 kcal ó 5,7-8,6 g/100 ml)

Entre los diferentes disacáridos se dará preferencia a la lactosa. En cuanto a los demás tienen prioridad polisacáridos tales como la dextrinomaltoza, el almidón o los preparados a base de harina, quedando prohibida la utilización de ingredientes que contengan gluten (RD 72/1998).

2.2. Nuevos componentes bioactivos de las fórmulas infantiles

La investigación dedicada a la mejora de las fórmulas infantiles se centra, actualmente, en los componentes bioactivos de la leche humana. El objetivo no es imitar la composición exacta de la leche humana, puesto que hay determinados ingredientes que son difíciles de aislar, sino más bien conseguir los efectos funcionales que se observan en niños amamantados.

Cualquier modificación de los requisitos establecidos para las fórmulas infantiles, ya sea adición de nuevos ingredientes o modificación de la cantidad, debe estar basada en un beneficio esperado (nutricional, funcional, tecnológico, etc). Este beneficio debe estar claramente justificado por estudios preclínicos y clínicos, que demuestren la efectividad y seguridad de la nueva formulación. Los

comités de expertos en nutrición infantil establecen una serie de condiciones en las que se han de realizar dichos estudios, si se quiere reclamar el efecto funcional de un determinado ingrediente (Agett P y col, 2003).

Este tipo de estudios suelen ser muy costosos, ya que generalmente son multicéntricos e incluyen un gran número de niños. Además el seguimiento de los pacientes suele ser de varios años, para analizar los posibles efectos tardíos de los nuevos ingredientes y/o modificaciones que se quieren introducir.

2.2.1. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL):

Suplementación de las fórmulas infantiles con DHA y AA

De entre todos los componentes que han sido estudiados como posibles ingredientes funcionales en las fórmulas infantiles, los AGPI-CL son los más ampliamente usados en nutrición infantil.

Numerosos estudios relacionan la lactancia materna con un mejor desarrollo visual y cognitivo (Andersson JW y col, 1999; SanGiovanni JP y col, 2000). Los componentes de la leche humana que podrían explicar parcialmente este hecho son el ácido araquidónico (AA, 20:4 n-6) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:5 n-3). Ambos ácidos constituyen la mayor proporción de los fosfolípidos que componen las membranas celulares de la retina y del cerebro.

Las fuentes de grasa utilizadas convencionalmente para las fórmulas infantiles no contienen ninguno de estos dos ácidos grasos (Alles-Martin S y col, 2004). Por elongación y desaturación, AA y DHA pueden ser sintetizados a partir de ácido linoleico (LA, 18:2 n-6) y α -linolénico (ALA, 18:3, n-3) que sí se encuentran en todas las fórmulas infantiles. Sin embargo, estas actividades enzimáticas están limitadas en niños (Koletzko B y col, 1999). Por esta razón, los niveles de AA y DHA en la membrana de los eritrocitos son mayores en niños amamantados que en los alimentados con fórmula (Alles-Martin S y col, 2004).

La evidencia del efecto beneficioso de los AGPI-CL en el recién nacido, ha llevado a diversos comités de expertos y organizaciones profesionales (*British Nutrition Foundation*, *World Health Organization/FOOD and Agricultural Organization of United Nations* y *The International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*) a recomendar la adición de AA y DHA a las fórmulas infantiles. Así, se ha establecido que es aconsejable que las fórmulas infantiles contengan al

menos un 0,2% del total de ácidos grasos como DHA y 0,35% como AA (Koletzco B et al, 2000).

En el mercado español existen actualmente varios preparados para lactantes que contienen DHA y AA: *Adapta 1* (Novartis), *Blemil plus 1* (Ordesa) y *Enfalac 1 premium* (Mead-Johnson), *Alprem* (Nestlé), *Similac Special Care* (Abbott).

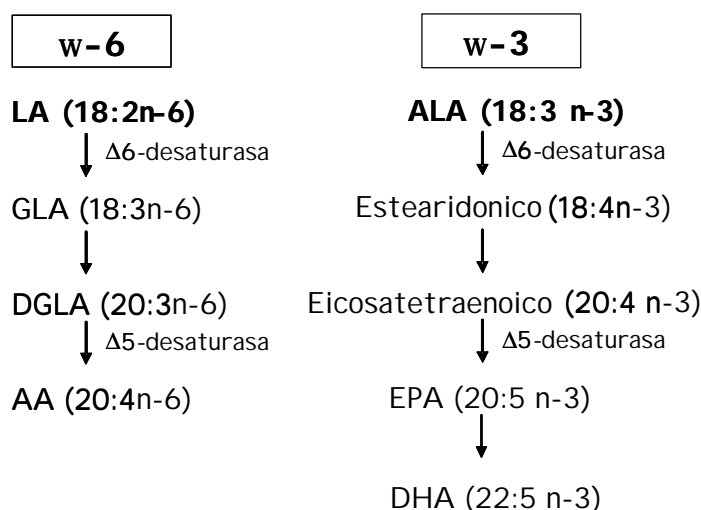


Figura 2-1. Esquema de la síntesis de AGPI-CL de las series $\omega 6$ y $\omega 3$.

Posición estructural del ácido palmítico en los triglicéridos

Otro aspecto que parece tener importancia en los efectos beneficiosos de la leche humana es la estructura de los triglicéridos. En la leche materna el 70% del ácido palmítico se encuentra esterificado en la posición 2 del triglicérido (posición β). Así se absorbe más fácilmente, ya que las lipasas humanas no pueden romper los enlaces en esta posición y el ácido graso se absorbe en forma de 2-monoglicérido (Rivero M y col, 2003).

Al contrario de lo que ocurre en la leche materna, en la mayor parte de las fórmulas infantiles el ácido palmítico se presente principalmente en las posiciones 1 y 3. Durante la digestión de las grasas los ácidos grasos situados en estas posiciones quedan libres a nivel del lumen intestinal, lo cual resulta desfavorable para su absorción, debido a la tendencia de los ácidos grasos libres a formar sales insolubles de calcio (jabones). Estas sales precipitan y son difícilmente

absorbidas por el neonato, lo que disminuye el aprovechamiento de la grasa y del calcio (figura 2-2).

Carnielli y colaboradores (1996) compararon una fórmula infantil con triglicéridos similares a los de la leche humana (palmítico esterificado principalmente en posición 2), con otra fórmula estándar (palmítico principalmente en posiciones 1 y 3). Se observó que la absorción de calcio y de ácidos grasos es mejor cuando el ácido palmítico está esterificado en la posición 2 del triglicérido.

Otro estudio demostró que, aumentando la proporción de palmítico en posición 2 en una fórmula infantil, las heces de los neonatos eran más consistentes y presentaban menos formación de jabones, siendo más parecidas a las de niños amamantados (Kennedy et al, 1999). Además los niños alimentados con esta nueva fórmula demostraron una mejor mineralización ósea, lo que supone una mejor absorción de calcio.

En las fórmulas infantiles, la opción de incrementar indiscriminadamente la concentración de calcio, para favorecer una correcta mineralización ósea, no parece una alternativa adecuada, ya que daría lugar a la formación de jabones cálcicos con los ácidos grasos. Aunque actualmente son muy pocas las fórmulas infantiles en las que está aumentado el porcentaje de palmítico en posición 2, hay datos que evidencian que esta modificación podría mejorar la absorción de la grasa y del calcio.

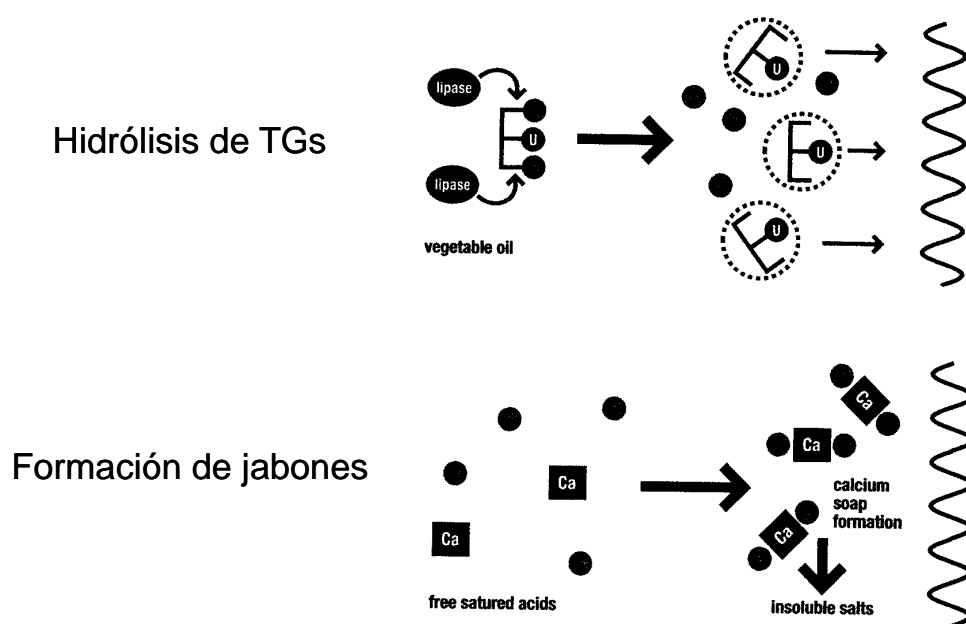


Figura 2-2. Hidrólisis de triglicéridos y absorción de ácidos grasos y de calcio.

2.2.2. Probióticos y prebióticos:

Una de las principales diferencias entre los niños amamantados y los alimentados con fórmula, es el desarrollo de la flora intestinal. Así, se ha observado una mayor colonización por bacterias lácticas y bifidobacterias, en el intestino de niños alimentados con leche materna. Este efecto se debe, principalmente a la presencia de oligosacáridos en la leche humana. Aunque, recientemente, se ha descubierto la presencia de bacterias ácido-lácticas en la leche materna, lo que también contribuiría a esta mayor colonización (Martín R y col, 2003).

Efectos de la adición de oligosacáridos a fórmulas infantiles

Los principales componentes de la leche humana que favorecen el crecimiento de bacterias probióticas son los oligosacáridos. La leche de vaca, normalmente utilizada para la elaboración de fórmulas infantiles, contiene solamente trazas de oligosacáridos.

Diversos estudios han investigado el efecto prebiótico de estos compuestos, y la posibilidad de añadirlos a las fórmulas infantiles. Así, Moro y colaboradores (2002) concluyeron que una mezcla de 90% de transgalactooligosacáridos (trans-GOS) y 10% de fructooligosacáridos (FOS), tenía un claro efecto bifidogénico en niños nacidos a término. La suplementación de una fórmula infantil con dicha mezcla de oligosacáridos (0,4-0,8 g /100ml) aumentó de forma significativa el número de bifidobacterias en la flora fecal, haciéndola más parecida a la de niños amamantados. En otro estudio, se observó que con esta misma mezcla, las subespecies de bifidobacterias en las heces de los niños eran muy similares a las de niños alimentados con leche humana (Knol J y col, 2002).

Guesry y colaboradores (2000) probaron los efectos de FOS solos y aunque observaron un aumento en la cantidad de heces, no se vio efecto bifidogénico. Por tanto, parece probable que los diferentes tipos de oligosacáridos tengan distinta eficacia como prebióticos.

En base a estos y otros datos científicos, el Comité de Alimentos de la Comisión Europea ha concluido que se pueden suplementar las fórmulas con un máximo de 0,8 g/dl de una mezcla de 90% de trans-GOS y 10% de FOS.

Actualmente existen en el mercado diferentes alimentos infantiles enriquecidos con oligosacarídeos (tabla 2-5).

Nombre	Tipo de producto	Fabricante	Enriquecido con
Almirón Ommneo 1	Leche de inicio	Nutricia	FOS/GOS
Conformil 1	Leche de inicio	Milupa	FOS/GOS
Conformil 2	Leche de continuación	Milupa	FOS/GOS
Nativa 2	Leche de continuación	Nestlé	Bífidus BL ¹ + ST ²
Nidina 2	Leche de continuación	Nestlé	Bífidus BL+ ST
Simbiotic	Leche de continuación	Nutriben	Bífidus BL+ ST/FOS
Almirón Omneo 2	Leche de crecimiento	Nutricia	FOS/GOS
Baby 2	Leche de crecimiento	Hero	Bífidus Bb ³ y BL
Blemil 3 efcto bífidus	Leche de crecimiento	Ordesa	FOS
Blevit Plus Bífidus	Cereales infantiles	Ordesa	FOS

Tabla 2-5. Alimentos infantiles enriquecidos con pre- y probióticos. (Martínez-Férez A, 2004). ¹ *Bifidobacterium longum*, ² *Streptococcus thermophilus*, ³ *Bifidobacterium bifidum*.

Efectos de la adición de probióticos a las fórmulas infantiles

A principios de los años 90 se empezó a investigar sobre los efectos de la adición de bacterias probióticas a las fórmulas infantiles. Así, Langhendries y colaboradores (1995) observaron que un grupo de niños alimentados con una fórmula adicionada de bifidobacterias, presentaban una flora intestinal muy similar a la de los niños amamantados.

En otros trabajos se han estudiado los efectos funcionales que esta mayor colonización por probióticos podría tener en recién nacidos. Roos y Katan publicaron varios artículos entre 1988 y 1998, de los que se concluye que el consumo de *Lactobacillus GG* puede acortar el curso de la diarrea causada por rotavirus. Esta misma bacteria ha demostrado ser efectiva en la prevención de la diarrea, tanto en niños con alto riesgo de infección, como en los que son sometidos a tratamiento con antibióticos.

Otra patología en la que los probióticos parecen tener un efecto beneficioso, es la alergia alimentaria. Parece ser que los niños con un alto riesgo de alergia tienen una flora intestinal característica. Determinadas bacterias tienen la capacidad de modular la respuesta inmune, regulando el equilibrio entre la respuesta T_{H2} (proalérgica) y la T_{H1} (proinflamatoria). Así, se ha demostrado que

la suplementación con *Bifidobacterium animalis* BB-12 o *Lactobacillus* GG mejora la respuesta alérgica en niños con eczema atópico (Isolauri E y col 2000).

A la vista de estos resultados y conocida la presencia de bacterias lácticas en la leche materna, estas bacterias son unos candidatos muy prometedores para su utilización como probióticos en la composición de fórmulas infantiles. Es más, dado que los efectos de los pre- y probióticos parecen ser sinérgicos, en el mercado existen actualmente alimentos infantiles enriquecidos con una mezcla de ambos componentes, lo que se conoce con el nombre de simbiótico (tabla 2-5).

2.3. Fórmulas infantiles especiales

Las leches especiales son fórmulas elaboradas especialmente para lactantes y niños pequeños que tienen problemas o limitaciones de absorción, digestión o incapacidad para metabolizar determinadas sustancias. Para su elaboración se suele partir de las fórmulas convencionales y a partir de ellas se realizan modificaciones en la composición, para adaptarlas a las necesidades específicas de la alteración a la que se dirigen (figura 2-3).

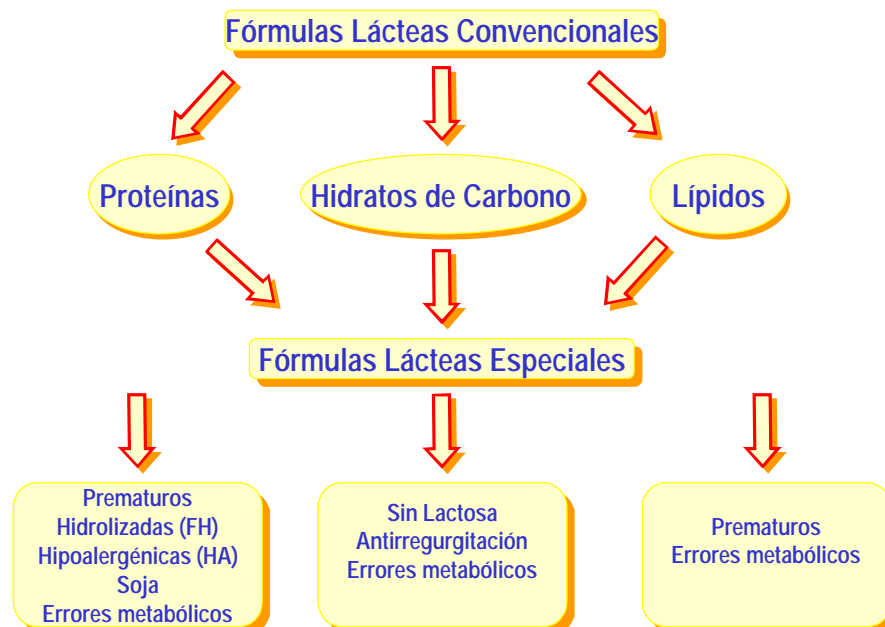


Figura 2-3. Elaboración de fórmulas especiales. (Rivero M y col, 2003).

2.3.1. Fórmulas sin lactosa:

Son fórmulas infantiles a base de leche de vaca en las que se ha sustituido la lactosa por otros hidratos de carbono como dextrinomaltoza, polímeros de glucosa, sacarosa o glucosa. Estas fórmulas se utilizan en casos de intolerancia primaria o secundaria a la lactosa, debido a un déficit de la enzima lactasa encargada de su metabolización (tabla 2-6).

Causas de la deficiencia de lactasa	
Primarias	Secundarias
Alactasia genérica precoz	Malnutrición
Alactasia genérica tardía o radical	Gastroenteritis bacteriana
Déficit madurativo de lactasa	Infestación por <i>Giardia lamblia</i>
	Enteropatía inducida por leche de vaca
	Enteropatía inducida por proteína de soja
	Enteropatía inducida por gluten
	Sobrecrecimiento bacteriano
	Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)
	Síndrome de intestino corto
	Yatrogenia

Tabla 2-6. Causas de la intolerancia a la lactosa por déficit de lactasa (Riviero M y col, 2003).

2.3.2. Fórmulas a base de proteínas hidrolizadas y fórmulas de proteínas vegetales:

Estas fórmulas están compuestas por proteínas predigeridas o por proteínas de origen vegetal, que son de utilidad en casos de intolerancia a las proteínas de la leche de vaca (principalmente alergia a la proteína) y en casos en los que la absorción está comprometida (intestino corto, diarrea grave, insuficiencia pancreática, colestasis crónica, etc.).

En las fórmulas hidrolizadas las proteínas de la leche de vaca son sometidas a tratamientos térmicos y/o enzimáticos que reducen las proteínas a péptidos de bajo peso molecular, más fáciles de absorber y con escasa alergenicidad (ver apartado 4.1.1).

Las fórmulas a base de soja se utilizan desde 1929, con diferentes propósitos: intolerancia a las proteínas de leche de vaca (ver apartado 4.1.1), intolerancia a la lactosa o en niños cuyos padres eligen una dieta vegetariana

para el neonato. Las primeras fórmulas a base de harina de soja tenían numerosos inconvenientes organolépticos y nutricionales (Tomson WA, 1979). Sin embargo actualmente muchos de ellos han sido superados en las nuevas fórmulas, elaboradas a partir de proteína de soja aislada y enriquecidas en componentes en los que ésta es deficitaria, como la metionina, hierro, zinc, etc (Rivero M y col, 2003). El consumo de las fórmulas a base de soja en Europa es bajo, al contrario de lo que ocurre en EEUU, donde el 25% de los recién nacidos se alimenta con este tipo de fórmulas (American Academy of Pediatrics, 1998).

2.3.3. Fórmulas para prematuros y recién nacidos de bajo peso:

Estas fórmulas van dirigidas a neonatos con peso al nacer igual o inferior a 1500g. Estos niños tienen una reserva muy escasa de nutrientes, especialmente los de peso inferior a 1000g, y sus requerimientos energéticos, de agua y de determinados nutrientes son muy elevados (Riviero M y col, 2003). Además suelen tener serias deficiencias por inmadurez de los sistemas relacionados con la absorción, digestión, metabolismo y excrección.

Las fórmulas destinadas a estos neonatos deben cubrir una serie de objetivos:

- Aporte de nutrientes adecuado a un ritmo de crecimiento semejante al correspondiente al último trimestre de gestación.
- Correcto desarrollo del sistema nervioso central.
- Aporte de los elementos necesarios para continuar el desarrollo de la función digestiva y la adaptación metabólica y endocrina.
- Ofrecer nutrientes fácilmente absorbibles.
- Mejorar los depósitos de nutrientes.

2.3.4. Fórmulas antiregurgitación:

El reflujo gastroesofágico se define como el paso involuntario del contenido gástrico al interior del esófago. Según su intensidad este fenómeno puede tratarse mediante terapias dietéticas, aunque en casos más graves es necesario recurrir a la cirugía.

En el caso de lactantes el reflujo gastroesofágico recibe el nombre de regurgitación y afecta al 50% de la población infantil durante los dos primeros meses de edad, mientras que la prevalencia disminuye a un 1% a los doce meses de vida, como consecuencia de la mayor madurez del sistema digestivo.

La medida dietética más recomendada en los casos de regurgitación es el espesamiento de la leche. Se ha demostrado que una mayor viscosidad y densidad de los alimentos reduce el número de reflujos. Entre los productos empleados como espesantes, el más utilizado es la harina de algarroba, seguido del almidón precocido.

La práctica de reducir el volumen de alimento y aumentar la frecuencia no es una solución definitiva ya que el reflujo se produce con mayor frecuencia en la fase postprandial, por lo que se aumentaría el número de reflujos.

3. LA LECHE DE CABRA: ¿UNA ALTERNATIVA VÁLIDA?

Las ventajas nutricionales de la leche de cabra han sido reconocidas desde hace mucho tiempo. De hecho su utilización en alimentación humana fue frecuente hasta finales del siglo XIX. Fue entonces cuando comenzó a introducirse la leche de vaca de manera casi exclusiva, ya que diversos estudios habían sugerido que los niños alimentados con leche de cabra tenían una mayor incidencia de infecciones (Marfan AB, 1903). Sin embargo, en estos estudios se comparaba la leche de cabra cruda con la leche de vaca esterilizada, de ahí que la leche de cabra sufriera un importante descrédito, principalmente en Europa.

Actualmente el consumo de leche de cabra sigue siendo muy bajo en Europa, a pesar de que los tratamientos higiénicos a los que se somete la leche de vaca, eliminan el riesgo de infección que se asociaba al consumo de leche de cabra. Además, la leche caprina tiene una serie de ventajas respecto a la bovina, que la hacen especialmente adecuada para nutrición infantil.

A pesar de su bajo consumo, la leche de cabra está adquiriendo un gran interés nutricional en la actual tendencia hacia la alimentación saludable en los países desarrollados (Chanda RC y col, 1992).

3.1. **Mercado de la leche de cabra en España**

La producción mundial de leche de cabra se situaba en el año 2000 en 12 millones de toneladas, de las cuales el 14% (1,68 millones de toneladas) se produjeron en la Unión Europea (*Food and Drug Organization, FAO Production Yearbook 2000*). Esta cifra es muy inferior a la producción mundial de leche de vaca que se estimaba en ese mismo año en 470 millones de toneladas, de las que aproximadamente el 35% se produjeron en la Unión Europea.

En España la producción de leche de cabra en el año 1999 fue de 358.000 toneladas, el tercer país europeo después de Francia y Grecia (*FAO Production Yearbook 2000*). Existen grandes diferencias entre las distintas comunidades autónomas, siendo Andalucía la mayor productora de leche de cabra con un 56% de la producción española (199.770 toneladas).

En cuanto al destino de la leche de cabra, en España el 95% se destina a la elaboración de queso por las industrias lácteas (tabla 3-1), lo que convierte a

España en el quinto país mundial productor de queso de cabra. Sin embargo la cantidad de leche de cabra destinada al consumo directo es muy baja.

Con estos datos podemos concluir que España, y concretamente Andalucía, tienen una producción de leche de cabra de las más altas de Europa, a la altura de países como Francia o Grecia. A pesar de ello, el consumo directo de leche caprina es mucho más bajo en España que en estos países.

	Total	Consumo directo en la explotación	Producción de queso en la explotación	Entregado a industrias lácteas
ESPAÑA	358.044	11.820	33.676	308.592
Andalucía	199.770	8.192	8.192	184.975
Castilla La Mancha	51507	1082	346	49901
Canarias	37587	1109	24448	11950
Región de Murcia	18164	70	16	18053
Castilla León	16032	633	969	14293
Comunidad Valenciana	5895	6	2	5887
Cataluña	3071	31	1225	1743
Aragón	1796	327	218	1246

Tabla 3-1. Producción y destino de la leche de cabra en España y en las comunidades autónomas con una mayor producción. (Adaptado de <http://capra.iespana.es>).

3.2. Principales diferencias en la composición de las leches de vaca y cabra

Las leches de vaca y cabra tienen más cosas en común entre ellas que con la leche humana. A grandes rasgos, las tres leches son isocalóricas, ya que aportan la misma cantidad de energía por unidad de volumen (750 kcal/l). No obstante en las leches de vaca y cabra la proteína es, tras la grasa, el componente que más energía aporta, mientras que en la leche humana es la lactosa (Chandan RC y col, 1992).

A pesar de que el perfil calórico y la composición general sean similares en las leches caprina y bovina, a continuación se comentan diferencias en determinados componentes que hacen a la leche de cabra algo más parecida a la humana.

3.2.1. Diferencias en la composición proteica:

Una característica importante de la leche de cabra es que su composición proteica varía mucho de una raza a otra, debido a la gran variabilidad genética que caracteriza a este animal (Martin P, 1996). Si consideramos un genotipo “estándar”, la composición proteica global, así como la cantidad de proteínas, es muy similar en las leches bovina y caprina. Sin embargo, y aunque la proporción caseínas:proteínas del lactosuero es también similar (80:20 aproximadamente), las caseínas de la leche de cabra son más solubles y por tanto su absorción es más fácil (Boza J y col, 1997). Por tanto, la calidad de la proteína de la leche de cabra es mayor que la de la leche de vaca. Así se demuestra en un reciente estudio realizado en ratas con una resección parcial del intestino delgado, en el que se observa que las ratas que consumieron dieta a base de leche de cabra tenían un índice de crecimiento superior a las que consumieron leche de vaca o una dieta estándar (López-Aliaga I y col, 2003).

Otra diferencia importante es la menor cantidad de α 1-caseína de la leche de cabra (5% del total de proteínas, frente al 35% en la leche de vaca) (Martin P, 1996). Esta proteína, que está ausente en la leche humana, es considerada uno de los principales alérgenos responsables de la alergia a la proteína de la leche de vaca (APLV) (Bianca-Maria E y col, 2001).

Por otra parte, tanto las caseínas como las proteínas del lactosuero, presentes en las leches de mamíferos, contienen péptidos bioactivos que se liberan tras la acción de las proteasas digestivas. Aunque la composición proteica sea similar, la variabilidad estructural de las proteínas de diferentes especies, puede originar diferentes tipos de péptidos. Hay numerosos trabajos que demuestran la actividad biológica de los péptidos derivados de la leche de vaca (Clare AD y col, 1999). Sin embargo, apenas existen estudios sobre los posibles efectos funcionales de los péptidos de la leche de cabra.

3.2.2. Diferencias en la composición lipídica:

La cantidad total de materia grasa es similar en las leches de vaca y cabra (3,2-3,8%), y también muy parecida a la de la leche humana. El contenido en colesterol (0,3-0,6%) y en fosfolípidos (1%) es también similar en las leches de las tres especies.

Digestibilidad de las grasas lácteas

La materia grasa de la leche es secretada por las glándulas mamarias en forma de glóbulos grasos, dando lugar a una emulsión lipídica. Estos glóbulos grasos están formados principalmente por un núcleo de triglicéridos, rodeado de una capa externa constituida por lípidos polares (fosfolípidos principalmente) y proteínas. Aunque el diámetro medio de los glóbulos grasos es similar (4µm) en las leches de vaca y cabra, el porcentaje de glóbulos de grasa de pequeño diámetro (<3µm) es mayor en la leche de cabra, lo cual podría permitir su mejor digestibilidad, ya que estos glóbulos son más accesibles para las lipasas que participan en la digestión lipídica (tabla 3-2).

Por otra parte, tanto la leche de vaca como la de cabra contienen cantidades importantes de la enzima lipoprotein-lipasa (LPL). Este enzima juega un papel muy importante en la lipólisis espontánea de la leche (hidrólisis de triglicéridos, principalmente en posición 3, para dar ácidos grasos libres). En el caso de la leche de vaca la LPL se encuentra ligada a las micelas de caseína, mientras que en la leche de cabra está más ligada a los glóbulos de grasa, facilitando dicha hidrólisis. De ahí que la leche de cabra presente un mayor porcentaje de ácidos grasos libres (0,6% del total de grasa, frente a 0,4% en leche de vaca), lo que también contribuye a su mayor digestibilidad (Chilliard Y, 1996).

	Cabra	Vaca	Humana	
			Leche	Calostro
Materia grasa (%)	3,2	3,8	3,8	2,6
Glóbulos de grasa				
Diámetro medio (µm)	3,5	2,5-4,6	4	1,8
% < 3µm	63	43		

Tabla 3-2. Materia grasa y tamaño de los glóbulos en las leches humana, caprina y bovina. (Adaptado de Chilliard Y, 1996).

Efectos beneficiosos de los triglicéridos de cadena media (TCM):

Probablemente, una de las principales diferencias en la composición lipídica de las leches de vaca y cabra está en el tipo de ácidos grasos que componen los triglicéridos. En la leche de cabra el porcentaje de ácidos grasos de

cadena media (C6:0 caproico, C8:0 caprílico, C10:0 cáprico) es superior al de la leche de vaca (figura 3-1). Así, la leche de cabra es más rica en triglicéridos de cadena media (TCM). Estos triglicéridos son una fuente de energía rápida, ya que se absorben directamente a nivel del intestino delgado proximal y no necesitan de las sales biliares para su absorción. Además, la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena media es, en parte, independiente de los niveles de carnitina, lo cual supone una ventaja en casos de déficit de este enzima, como ocurre en los recién nacidos (Odle J, 1997).

Por esta razón estos triglicéridos podrían tener efectos beneficiosos en situaciones metabólicas desfavorables, como ocurre en las enfermedades hepáticas, pacientes inmunodeprimidos o en el recién nacido, cuyo metabolismo es aún inmaduro. Así, los TCM han sido utilizados en la nutrición parenteral de pacientes con enfermedades críticas y en niños prematuros, con mejores resultados que los triglicéridos de larga cadena (TLC) (Chan S y col, 1998).

Debido también a su rápida absorción, los TCM han sido estudiados en la prevención de la obesidad. Los ácidos grasos derivados de estos triglicéridos son rápidamente oxidados en el hígado, por lo que estimulan la saciedad de forma rápida, disminuyen los depósitos de grasa y facilitan el control del peso, sin modificar el aporte energético (St-Onge MP y col, 2002).

Finalmente, como se verá más adelante, los TCM favorecen la absorción de determinados minerales.

3.2.3. Diferencias en la composición glucídica:

Los oligosacáridos de la leche de cabra son más similares a los de la leche humana

Tanto en la leche de vaca como en la leche de cabra el hidrato de carbono más abundante es la lactosa (4,7-4,8%). Sin embargo, una diferencia muy importante en la composición glucídica de ambos tipos de leche reside en los oligosacáridos.

La leche de vaca sólo contiene trazas de estos compuestos, mientras que en la leche de cabra la concentración es unas diez veces superior. Además, los oligosacáridos de la leche de cabra se caracterizan por su gran variabilidad estructural, lo que los hace más parecidos a los que existen en la leche humana

(ver figura 1-1). Otra característica importante es su alto contenido en galactosa, azúcar importante para el desarrollo cerebral del recién nacido (Martínez-Férez A, 2004; Riordan J, 1998).

La similitud de los oligosacáridos de las leches de cabra con los de la leche humana, sugiere que estos compuestos podrían tener la misma bioactividad (ver apartado 1.2.2). De hecho, se ha demostrado *in vitro* que los oligosacáridos de leche de cabra inducen la maduración del epitelio intestinal, ya que favorecen la diferenciación de células Caco-2 (Martínez-Férez A, 2004). Sin embargo, no existen estudios sobre su posible papel como prebióticos o como receptores de patógenos.

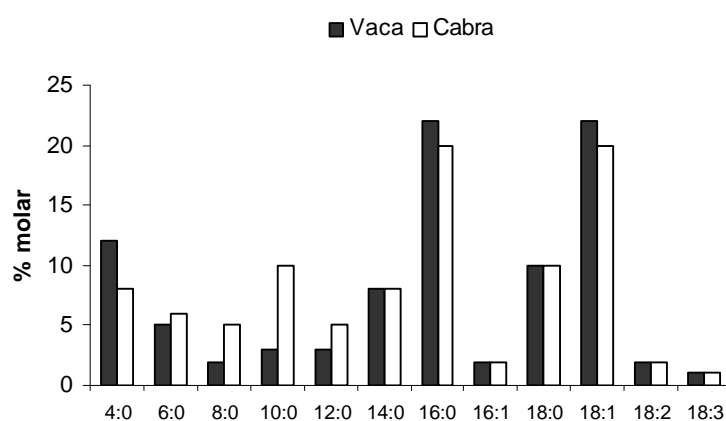


Figura 3-1. Composición en ácidos grasos de las leches bovina y caprina. (Adaptado de Chilliard Y, 1996).

3.2.4. Diferencias en la composición mineral:

Al analizar la composición mineral de un determinado tipo de leche no sólo hay que tener en cuenta las cantidades de cada mineral, sino también su biodisponibilidad. En este sentido, existen interacciones entre diferentes minerales, y de éstos con otros componentes lácteos, que pueden afectar a su absorción.

Así, las composiciones minerales de las leches de vaca y cabra no presentan grandes diferencias. Cabría destacar la mayor cantidad de potasio y cloro de la leche de cabra y su menor contenido en sodio (tabla 3-3). Sin

embargo, existen estudios que demuestran que la biodisponibilidad de ciertos minerales sí es diferente en ambos tipos de leche.

La biodisponibilidad del hierro es mayor en la leche de cabra

El hierro es un elemento de gran importancia biológica, ya que participa en el transporte (hemoglobina) y almacenamiento (mioglobina) de oxígeno, así como en el metabolismo oxidativo.

Este elemento es un claro ejemplo de cómo las interacciones entre diferentes componentes pueden aumentar la biodisponibilidad. La leche de cabra contiene una cantidad ligeramente superior de hierro que la leche de vaca, y sin embargo la biodisponibilidad de este elemento parece ser mucho mayor en la leche de cabra. Recientes estudios han demostrado que, al comparar ratas alimentadas con leches de vaca o cabra liofilizadas, las segundas presentan un mayor índice de absorción de hierro (López Aliaga I y col, 2000). Esto podría deberse al mayor contenido en TCM de la leche de cabra. Como ya se ha mencionado, estos triglicéridos son una fuente de energía rápida, por lo que podrían favorecer la síntesis de proteínas transportadoras.

Existen otros componentes que se encuentran en mayor cantidad en la leche de cabra que en la de vaca, y que podrían participar en esta mayor biodisponibilidad del hierro. Entre ellos, algunos aminoácidos como la cisteína o la lisina, que actúan como agentes quelantes, favoreciendo la solubilidad del hierro (Van Campen DR, 1973). También la vitamina C, que forma un quelato con el hierro que permanece soluble a pH alto dentro del intestino delgado, facilitando su absorción (Czajka-Narins DM, 1998). Finalmente, la mayor solubilidad de las proteínas de la leche de cabra, podría favorecer también la absorción del hierro.

	Vaca	Cabra
Macroelementos	mg/100ml	mg/100ml
Calcio	1200	1260
Fósforo	920	970
Potasio	1500	1900
Sodio	450	380
Cobre	1100	1600
Magnesio	110	130
Relación Ca:P	1,3	1,3
Microelementos	mg/100ml	mg/100ml
Zinc	3800	3400
Hierro	460	550
Cobre	220	300
Manganeso	60	80
Yodo	70	80
Selenium	30	20

Tabla 3-3. Composición mineral de las leches de vaca y cabra. (Adaptado de Guéguen L, 1996).

Los TCM también favorecen la absorción de magnesio

El magnesio es otro elemento con funciones biológicas importantes, ya que actúa como cofactor en más de 300 reacciones enzimáticas, que afectan, entre otras funciones, al metabolismo energético y a la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.

La cantidad de magnesio en la leche de cabra es también ligeramente superior a la de la leche de vaca (tabla 3-3). Un estudio en ratas cuya función intestinal estaba comprometida, demostró que la leche de cabra aumentaba la absorción de magnesio (López-Aliaga I y col, 2002).

Al igual que en el caso del hierro, los TCM parecen responsables de este efecto.

3.2.5. Diferencias en la composición vitamínica :

El bajo contenido en ácido fólico (vitamina B9) de la leche de cabra es uno de los principales inconvenientes de este tipo de leche, en comparación con la leche de vaca y la leche humana (tabla 3-4). Algunos casos descritos de anemia

megaloblástica (patología asociada a un déficit de esta vitamina) en niños de 3 a 12 meses, alimentados casi exclusivamente con leche de cabra, fueron una de las razones del descrédito que sufrió la leche caprina entre los años 60 y 70 (Sullivan LW y col, 1966). Esta carencia se debe a la presencia de una glicoproteína que presenta la capacidad de unir ácido fólico y que no se encuentra en la leche de vaca (Chanda RC y col, 1992).

La leche de cabra es igualmente pobre en vitamina B12, cuando se compara con la leche de vaca. Sin embargo esto no debería suponer un problema para un adulto con una dieta variada, ni tampoco para un recién nacido, puesto que la concentración es igualmente baja en la leche humana (tabla 3-4).

Por el contrario, la leche de cabra es más rica que la de vaca en niacina (vitamina B3), uno de los constituyentes fundamentales de los coenzimas NAD/NADP, que juegan un papel fundamental en el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas. Un déficit de esta vitamina ocasiona la enfermedad conocida como pelagra, caracterizada por dermatosis, diarrea y demencia.

	Humana	Vaca	Cabra
Vitamina A (mg)	0,06	0,035	0,040
Vitamina D (µg)	0,055	0,08	0,06
Vitamina E (mg)	0,23	0,11	0,04
B1 Tiamina (mg)	0,02	0,04	0,05
B2 Riboflavina (mg)	0,035	0,17	0,14
B3 niacina (mg)	0,16	0,09	0,27
B5 Ácido pantoténico (mg)	0,18	0,34	0,31
B6 piridoxina (mg)	0,01	0,04	0,05
B9 Ácido fólico (µg)	5,2	5,3	1
B8 Biotina (µg)	0,7	2	2
B12 cobalamina (µg)	0,04	0,35	0,06
Vitamina C	4	1	1,3

Tabla 3-4. Principales vitaminas de la leche humana en comparación con la de vaca y cabra.

3.2.6. Otros componentes minoritarios:

La concentración de poliaminas es mayor en la leche de cabra

Las poliaminas (espermidina, espermina y putrescina) son compuestos nitrogenados presentes en la leche de diferentes mamíferos, que parecen jugar

un papel importante en el desarrollo intestinal de los recién nacidos de diferentes especies.

La concentración de estas sustancias en la leche, varía en función del periodo de lactancia, probablemente debido a una adaptación a las necesidades del neonato (Ploszaj T y col, 1997). En la leche de vaca la concentración de espermina y espermidina es máxima en el calostro, debido a que la capacidad de síntesis de estos compuestos es baja los primeros días tras el nacimiento. Durante el primer mes de lactancia la concentración de estas sustancias disminuye, y permanece baja hasta el final de la lactancia (en el caso de la espermina incluso por debajo del límite de detección).

Por el contrario, la concentración de poliaminas en la leche de cabra permanece estable durante todo el periodo de lactancia (a excepción de la putrescina que disminuye durante las primeras semanas), y siempre los niveles son superiores a los de la leche de vaca (Ploszaj T y col, 1997). Este patrón de secreción de poliaminas es más parecido al que ocurre en la leche humana.

La mayor concentración de poliaminas se ha relacionado con la reducción del riesgo de padecer alergias alimentarias, ya que al favorecer la maduración intestinal dificultan el paso de alérgenos alimentarios. De hecho diferentes estudios sugieren que el menor riesgo de padecer alergias alimentarias en niños amamantados podría explicarse, al menos parcialmente, por la mayor concentración de espermina y espermidina en la leche humana comparada con las fórmulas infantiles disponibles en el mercado (generalmente a base de leche de vaca) (Dandriose G y col, 2000).

La leche de cabra es también más rica en nucleótidos

Como ya se comentó en el primer apartado, los nucleótidos son compuestos con un importante papel biológico, ya que participan en numerosos procesos fisiológicos (ver apartado 1.2.3). A pesar de que en la leche humana los nucleótidos suponen un alto porcentaje del nitrógeno no proteico (18-30%), la cantidad total de estos compuestos es mayor en la leche de otros mamíferos, como la vaca y la cabra.

Al contrario de lo que ocurre con las poliaminas, el patrón de secreción de nucleótidos es muy similar en las leches caprina y bovina. En el calostro la concentración es máxima, y a partir de las primeras semanas disminuye. Sin

embargo el contenido en nucleótidos totales es siempre mayor en la leche de cabra. La leche de vaca sólo es más rica en ácido orótico, nucleótido del que sólo se encuentran trazas en la leche humana (Jaubert A, 1996).

	Leche humana		Leche de vaca		Leche de cabra	
	Calostro	Madura	Calostro	Madura	Calostro	Madura
AMP	4	2,1	6,2	2	4,7	6,7
GMP	0,3	0,2	-	-	-	-
CMP	5,5	2	5,3	1,9	6,5	5,4
UMP	1,7	1,1	39	14,5	53,8	19,2
UDP G	1,4	0,9	36,2	-	60,7	19,6
UDP Ga	1,4	1	32	-	58	17,2
Ácido orótico	-	-	7,4	26,8	6,3	10,2

Tabla 3-5. Concentración ($\mu\text{mol}/100\text{ml}$) de las leches de vaca, cabra y humana. (Jaubert A, 1996). (AMP: adenosina monofosfato; GMP: guanosina monofosfato; CMP: citosina monofosfato; UMP: uridina monofosfato; UDP G: uridina difosfato glucosa; UDP Ga: uridina difosfato galactosa).

La leche de cabra contiene factores de crecimiento

Uno de los factores tróficos más destacados de la leche humana son los factores de crecimiento (TGF, IGF, EGF) que participan en procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación (ver apartado 1.2.1).

De entre ellos, el IGF-I y II han sido encontrados también en las secreciones preparto y en el calostro de vaca, disminuyendo en un 30-50% a partir del segundo día de lactancia (Malven PV y col, 1987). Los TGF- α y - β han sido identificados en las glándulas mamarias de la vaca, pero no está demostrada su presencia en la leche (Campana WM y col, 1995).

Son muy pocos los estudios que hacen referencia a la presencia de factores de crecimiento en la leche de cabra. Sin embargo, recientes trabajos de nuestro laboratorio han demostrado la presencia de EGF, IGF-I y TGF- β 2 en la leche caprina, aunque en concentraciones inferiores a las encontradas en la leche humana (López-Huertas E y col, 2004, resultados no publicados).

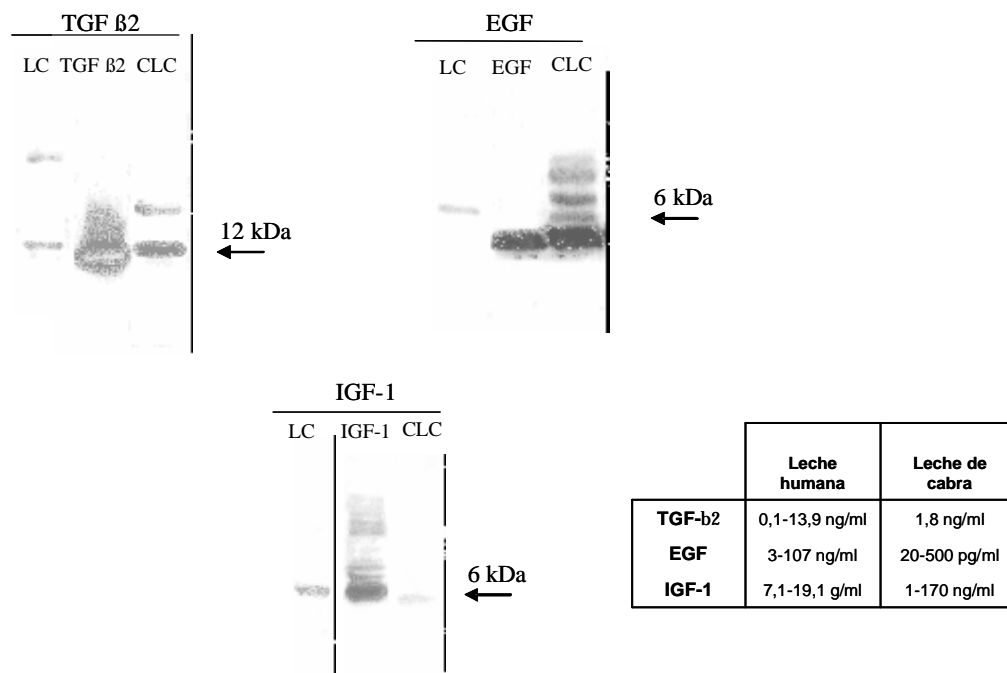


Figura 3-2. Factores de crecimiento en la leche de cabra y cantidades aproximadas respecto a la leche humana. (López-Huertas E y col, 2004, resultados no publicados). LC: leche de cabra; CLC: concentrado de leche de cabra.

3.3. La leche de cabra en nutrición infantil

3.3.1. Antecedentes de la utilización de leche de cabra en nutrición infantil:

Como ya se ha comentado, la utilización de leche de cabra en alimentación infantil fue frecuente hasta finales del siglo XIX. A partir de entonces diversos estudios, en los que se comparaban la leche de vaca esterilizada y la de cabra cruda, hicieron que ésta sufriera un importante descrédito, principalmente en Europa. Como consecuencia de estos estudios, en 1906 la *British Royal Society* relacionó el consumo de leche de cabra con la transmisión de brucelosis. Años más tarde, en 1922, Stoltaner publicó las primeras observaciones de anemia macrocítica megaloblástica en niños alimentados con leche de cabra, debido a la baja concentración de ácido fólico en esta leche.

Actualmente estos inconvenientes son fácilmente solucionables. Los mismos tratamientos higiénicos que se aplican a la leche de vaca, eliminan los riesgos de infección asociados al consumo de leche de cabra. En cuanto a la carencia de ácido fólico, su adición a las fórmulas hasta los valores recomendados cubriría las necesidades del recién nacido.

En estas condiciones, la leche de cabra podría ser una alternativa válida a la leche de vaca, sobre todo en casos de intolerancia (alergia leve a la proteína, reflujo gastroesofágico, diarreas, eczema, etc.). Diversos estudios han demostrado que la leche de cabra es tolerada por la mayoría de niños que sufren algún problema de intolerancia a la leche de vaca. Así, en un estudio llevado a cabo en 60 niños con algún problema de intolerancia a la leche de vaca, 46 de ellos respondieron positivamente a una fórmula basada en leche de cabra (Grzesiak T, 1996). Otro estudio en 55 niños intolerantes a la leche de vaca de edades comprendidas entre 0 y 5 años, demostró que la leche de cabra fue eficaz en 51 de los casos (Reinert P, 1988).

A pesar de ello, no existen estudios clínicos suficientes que comparen la leche de vaca y la de cabra en nutrición infantil. Esta es la principal razón por la que la legislación europea no autoriza actualmente la leche de cabra como fuente de proteína para fórmulas infantiles. Sin embargo esta leche sigue siendo utilizada en numerosos países anglosajones, así como en Asia y en África (Grzesiak T, 1996). De hecho en el mercado existen algunas fórmulas infantiles a base de leche de cabra como *Baby Goat* (Nueva Zelanda), *Caprima* (Holanda) y *Caprilac* (Francia).

3.3.2. ¿Es adecuada la leche de cabra para la nutrición infantil?

Como ya se ha comentado ampliamente, el mejor alimento para el recién nacido es la leche humana, ya que su composición está perfectamente adaptada a los requerimientos del recién nacido.

Cuando es necesario sustituir o suplementar la lactancia materna, se recurre a leches de otras especies de mamíferos que, evidentemente, están adaptadas a las necesidades de esa especie. La buena disponibilidad y la gran cantidad de estudios que avalan su seguridad, hace que la leche de vaca sea, principalmente, la fuente de proteínas para nutrición infantil utilizada en Europa.

Sin embargo, según se deduce del apartado anterior, la composición general de la leche caprina no es muy diferente a la de la leche bovina, e incluso en algunos aspectos su composición se asemeja más a la de la leche humana. Las principales características de la leche de cabra que la hacen especialmente adecuada para nutrición infantil se podrían resumir en las siguientes:

- Mayor digestibilidad proteica y menor contenido en α 1-caseína: estas características hacen que la proteína de la leche de cabra sea fácilmente utilizable, y posiblemente menos alergénica.
- Lípidos fácilmente digeribles y que suponen un aporte de energía rápido (MCTs).
- Alta concentración de oligosacáridos y su variabilidad estructural: este tipo de compuestos derivados de la leche de cabra han sido poco estudiados, pero su estructura y composición es similar a la de los aislados de la leche humana, cuya bioactividad sí está demostrada (ver apartado 1.2.2).
- Contenido elevado de compuestos bioactivos: poliaminas, ácido siálico, factores de crecimiento, etc.

Por otra parte, los inconvenientes, que también se han señalado en el apartado anterior, referentes a la carencia de ácido fólico y de vitamina B12, son fácilmente solucionables, mediante la suplementación con estas vitaminas hasta las cantidades recomendadas. Así mismo, el alto contenido en cloro y potasio hacen necesario un tratamiento de desmineralización parcial, mediante técnicas de electrodiálisis, que actualmente son también aplicadas a la leche de vaca que se destina a la alimentación infantil (Guéguen L, 1996).

Chanda y colaboradores (1992), en su revisión sobre aspectos nutricionales de la leche de cabra, concluyen que *“tras la fortificación adecuada, la leche de cabra es una opción láctea viable para cubrir los requerimientos nutricionales de niños y adultos”*.

Con esta perspectiva, la respuesta a la pregunta planteada sería que si bien la leche humana es el mejor alimento para el recién nacido, la leche de cabra podría ser igual de adecuada o incluso mejor para nutrición infantil que la leche de vaca.

4. LACTANCIA ARTIFICIAL Y LA SALUD DEL RECIÉN NACIDO.

El paso de la vida intrauterina a la extrauterina supone, para el recién nacido, su primer contacto con el entorno en el que se va a desarrollar. Este contacto no está exento de riesgos, ya que el sistema inmunológico del neonato, todavía inmaduro, debe enfrentarse a “agentes extraños” (microorganismos patógenos, antígenos alimentarios, etc) de los que hasta entonces había estado protegido por la madre.

Por esta razón, durante los primeros meses tras el nacimiento, es muy importante un alimento como la leche humana que, como ya se ha comentado, no sólo cubre las necesidades nutricionales del neonato sino que también contiene compuestos bioactivos que lo protegen de determinadas patologías (ver apartado 1.3).

De hecho, la sustitución de la leche materna por fórmulas infantiles a base de leche de vaca aumenta la incidencia de algunas enfermedades, principalmente de aquellas que se producen como consecuencia de la inmadurez intestinal del recién nacido (alergia a la proteína de la leche de vaca, enterocolitis necrosante, diarreas por infecciones gastrointestinales, etc) ya que el proceso de maduración intestinal está muy influenciado por la nutrición durante los primeros meses tras el nacimiento (Goldman AS, 2000). Por esta razón, la búsqueda de nuevos componentes bioactivos que imiten las propiedades funcionales de la leche humana es una de las principales líneas de investigación en nutrición infantil.

En este apartado se estudian con detalle la alergia a la proteína de la leche de vaca (APLV) y la enterocolitis necrotizante (ECN), como ejemplos de patologías cuya incidencia en neonatos aumenta como consecuencia de la combinación entre la inmadurez intestinal propia de la edad y el abandono de la lactancia materna.

4.1. Alergia a la proteína de la leche de vaca (APLV) y posibles medios de prevención

4.1.1. APLV: frecuencia, síntomas y posibles causas de su incremento:

La APLV es la alergia más frecuente en niños de hasta 2 años

La alergia a la proteína de la leche de vaca (APLV) es uno de los problemas más frecuentes de intolerancia a la leche de vaca que se producen en recién nacidos. En general, las alergias alimentarias ocurren en un 5%-10% de los niños de hasta 2 años, y entre ellas la APLV es la más común, ya que afecta a un 2%-6% de los niños de esa edad (Hill DJ, 1996). Se trata de una patología claramente asociada a la lactancia artificial, ya que sólo un 0,5% de los niños amamantados sufre la APLV, probablemente debido a la presencia de antígenos bovinos en la leche materna, como consecuencia de la dieta de la madre (Host A y col, 1988).

La APLV se caracteriza por síntomas muy poco específicos, lo que la hace difícil de diagnosticar. En la mayoría de los casos la sintomatología suele ser inmediata al contacto con la proteína (urticaria, diarrea, rinoconjuntivitis o asma) y en casos más graves puede provocar *shock* anafiláctico y muerte (Exl BM E y col, 2001). Sin embargo, la APLV no es simplemente una patología importante pero aislada, sino que suele ser el comienzo de la llamada "carrera atópica". La APLV juega un papel clave en la patogénesis de otras enfermedades atópicas que sufre el niño en edades más avanzadas: otras alergias alimentarias, rinitis, asma y especialmente la dermatitis atópica. Entre el 30 y el 80% de los niños con APLV y/o dermatitis atópica desarrollarán posteriormente asma u otra alergia respiratoria (Guillet G y col, 1992).

La hipótesis de la higiene y sus implicaciones en la APLV

La APLV es cada vez más frecuente, sobre todo en las sociedades occidentales, en las que su incidencia se ha doblado en las últimas dos décadas (Aberg N y col, 1995). Un cambio tan drástico en tan poco tiempo no puede explicarse por los factores genéticos, aunque sin duda éstos influyen en la etiología de esta enfermedad. Las investigaciones recientes parecen apuntar más

al estilo de vida occidental, caracterizado por familias con pocos niños y buenas condiciones higiénicas que impiden un contacto continuo con microorganismos (Exl BM y col, 2001).

La homeostasis del sistema inmunológico se basa en el equilibrio entre dos tipos de respuestas linfocitarias: T_H1 y T_H2 (figura 4-1). Los linfocitos T_H1 se activan en presencia de microorganismos, lo que desencadena la liberación de determinadas citoquinas inflamatorias dirigidas a la eliminación de éstos ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-2$, $IFN-\gamma$, etc.). Por su parte, la respuesta T_H2 está diseñada para la defensa frente a parásitos y frente a proteínas extrañas al organismo (antígenos), y se caracteriza por la liberación de otras citoquinas que desencadenan la respuesta alérgica ($IL-4$, $IL-10$, etc.). Las citoquinas T_H1 inhiben la respuesta T_H2 y viceversa, de manera que en condiciones de homeostasis se mantiene un equilibrio entre ambas respuestas.

En los países occidentales, en los que las condiciones higiénicas son mucho mejores que en los países menos desarrollados, el contacto con microorganismos es poco frecuente, por lo que la liberación de citoquinas T_H1 está reducida, de manera que se rompe el equilibrio a favor de la respuesta T_H2 o alérgica. Según la hipótesis de la higiene, este desequilibrio sería la razón del aumento de la incidencia de alergias, y concretamente de la APLV, en las sociedades occidentales.

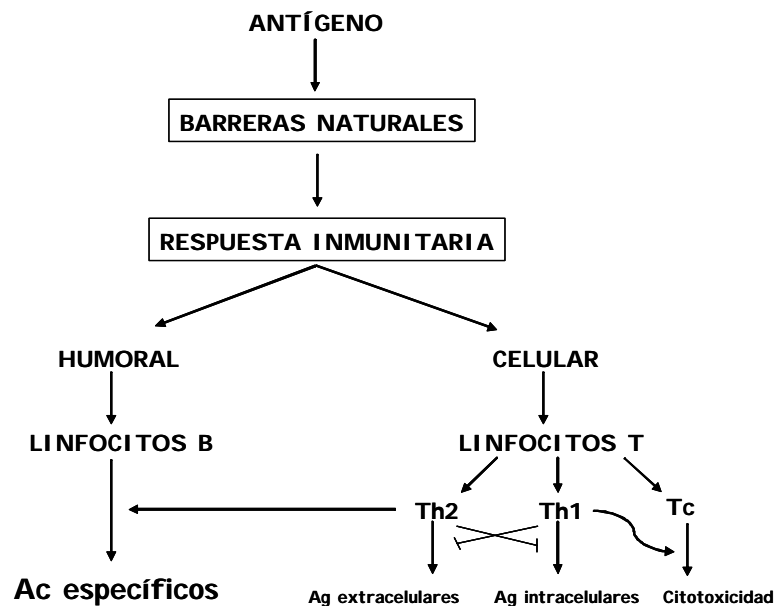


Figura 4-1. Respuesta del sistema inmunológico ante la entrada de antígenos.

Un determinado porcentaje de niños, llamados atópicos, reacciona de forma exagerada frente a antígenos inofensivos (alergenos), como las proteínas de la leche de vaca. Así, en el primer contacto con el alergen, la interleuquina-4 (IL-4) liberada por linfocitos T_H2 , estimula la producción de inmunoglobulinas E (IgE) por los linfocitos B. Estas inmunoglobulinas se unen a sus receptores de mastocitos y basófilos, de manera que el niño queda sensibilizado frente a las proteínas de la leche de vaca. Tras un segundo contacto con el antígeno, el entrecruzamiento de las IgE provoca la desgranulación de estas células, liberándose mediadores, principalmente la histamina, responsables de los síntomas de la alergia (figura 4-2).

4.1.2. El fenómeno de la tolerancia oral:

En el momento en que una proteína extraña es ingerida, sufre un proceso de hidrólisis en el estómago que reduce su tamaño y con ello su alergenicidad. Sin embargo, algunas proteínas escapan de este proceso de hidrólisis, absorbiéndose prácticamente intactas (Exl BM y col, 2001). Estas proteínas, que por una parte son perjudiciales porque pueden provocar fenómenos de alergia, son al mismo tiempo importantes para el correcto desarrollo de la inmunidad intestinal del recién nacido, ya que inducen la llamada tolerancia oral. Este fenómeno consiste en un proceso activo que conduce a una hiporrespuesta antígeno-específica, es decir, el sistema inmunológico “aprende” a no reaccionar frente a estos antígenos inofensivos, evitando así posteriores problemas de rechazo a estas y otras proteínas de la dieta del niño (Renz H y col, 1998).

El mecanismo a través del cual estos antígenos, llamados tolerógenos, inducen la tolerancia oral no está del todo claro, pero parece que depende de la dosis de antígeno. Altas dosis de antígeno inducen tolerancia por delección o anergia tanto de linfocitos T_H1 como T_H2 . Sin embargo múltiples dosis bajas de antígenos inducen otro tipo de respuesta linfocitaria conocida como T_H3 , caracterizada por la secreción de citoquinas, principalmente IL-10 y factor transformador de crecimiento- β (TGF- β), que producen una supresión activa de la respuesta inmunológica frente a esos antígenos (Exl BM y col, 2001).

La leche humana contiene cantidades pequeñas de antígenos alimentarios, derivados de la alimentación de la madre, que favorecen el

desarrollo de la tolerancia oral por parte del recién nacido, lo que facilita que otros alimentos sean tolerados tras el periodo de lactancia (Host A y col, 1990).

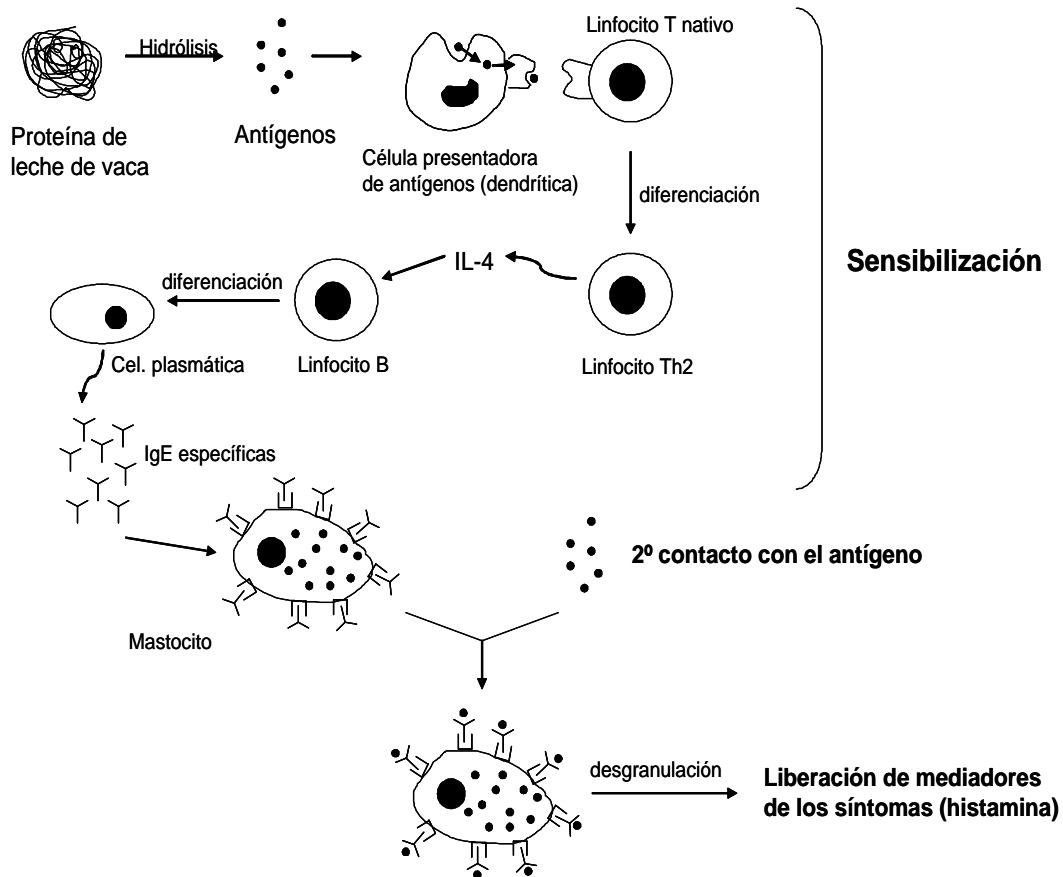


Figura 4-2. Mecanismo de la reacción alérgica a las proteínas de la leche de vaca.

4.1.3. Sustitutos de la leche humana en niños con APLV.

Aunque en algunos casos los síntomas de la APLV pueden aparecer durante el periodo de lactancia, en la mayoría se manifiestan en el periodo de alimentación con fórmulas infantiles (Host A, 1994). En el 7-15% de los niños con APLV los síntomas aparecen tras la primera comida a base de leche de vaca, pero lo más frecuente es que aparezcan entre la primera semana y el primer mes de la introducción de la leche bovina (Host A, 1994).

En estos casos, y en niños que no han mostrado síntomas pero tienen un alto riesgo de padecer APLV, la principal medida que se toma es la retirada de la

leche de vaca de la dieta (Host A, 1994). Como alternativas se utilizan las llamadas fórmulas hipoalergénicas: preparados a base de leche de vaca hidrolizada, de manera que el tamaño de las proteínas se reduce y con ello su alergenicidad; o bien fórmulas en las que la fuente de proteínas es la soja. En todos los casos el objetivo fundamental es evitar el contacto con proteínas de leche de vaca. Sin embargo se plantea otro problema, la inducción de la tolerancia oral necesaria para la posterior alimentación del niño.

Fórmulas a base de soja

Aunque este tipo de fórmulas son utilizadas en casos de APLV, lo cierto es que la proteína de soja es muy antigénica. Diferentes estudios muestran que la proteína de la soja es al menos igual de antigénica que la de vaca (May CD y col, 1982). De ahí que entre el 17% y el 46% de niños sensibilizados frente a la proteína de vaca sufran reacciones adversas a las proteínas de soja (Host A, 1994). Según la Academia Americana de Pediatría (1989), las fórmulas a base de soja, debido a su elevada antigenicidad, no son una buena medida para la profilaxis o prevención de la alergia

Además la proteína de soja es muy diferente a la de vaca, por lo que estas fórmulas no inducen tolerancia oral frente a las proteínas de vaca, lo que podría suponer posteriores problemas de intolerancia para el niño.

Por otra parte, recientes estudios han cuestionado el uso de la soja, por la presencia de determinados componentes que podrían tener efectos adversos sobre el sistema inmunitario y la fertilidad. Uno de estos estudios demuestra que la genisteína, un estrógeno presente en la soja, administrado a animales en la dieta produce un descenso del tamaño del timo y del número de algunas células inmunológicas (Yellayi S y col, 2003). En otro estudio llevado a cabo en ratas, se concluyó que una dieta rica en fitoestrógenos, también presentes en la soja, puede disminuir la fertilidad (COT Report, 2003).

De la misma forma existen componentes con propiedades antinutricionales, como los fitatos, que precipitan determinados minerales reduciendo su biodisponibilidad, lo que hace necesario el enriquecimiento de estas fórmulas con minerales como el hierro o el zinc (Erdman JW Jr y col, 1989).

Con todos estos datos y según el *Scientific Committee on Food* (SCF) las fórmulas a base de soja son adecuadas principalmente en casos de intolerancia a

la lactosa, y sólo como segunda elección en casos de APLV (SCF Report, 2003). Además este tipo de fórmulas tampoco son adecuadas para niños prematuros de menos de 1800g de peso (American Academy of Pediatrics, 1998).

Fórmulas extensamente hidrolizadas (FeH)

Las fórmulas extensamente hidrolizadas (FeH) son actualmente la primera elección en casos de APLV. Se utilizan desde hace más de 50 años, cuando *Mead Jonson* (USA) sacó al mercado la primera de estas fórmulas (*Nutramigen*) (Exl BM y col, 2001). Se trata de fórmulas a base de leche de vaca previamente sometida a tratamientos térmicos y/o enzimáticos que convierten las proteínas en péptidos con un peso molecular máximo de 3000 Da, aunque el 99% de ellos tiene un peso molecular inferior a los 1500 Da (Host A, 1994).

Los péptidos de este tamaño no son alergénicos, puesto que no pueden entrecruzar las IgE de la membrana de mastocitos, ni de los linfocitos B, por lo que este tipo de fórmulas son de elección en niños con APLV diagnosticada. Diferentes estudios muestran que las FeH no dan problemas de alergia en prácticamente el 100% de niños con APLV (Host A y col, 1992). El único problema de rechazo de estas fórmulas es debido a su sabor amargo, causado por la formación de determinados péptidos durante el tratamiento al que se somete la leche de vaca (Host A, 1994).

Pero el principal inconveniente de las FeH es que los péptidos de un tamaño tan pequeño no inducen la necesaria tolerancia oral, puesto que no son reconocidos por las células T_H3. Algunos estudios demuestran un cierto grado de tolerancia inducida en niños con alimentación mixta: leche humana y FeH, pero parece ser más bien debido a la presencia de antígenos en la leche materna (Zeiger RS y col, 1989).

Fórmulas parcialmente hidrolizadas (FpH)

Este tipo de fórmulas, mucho más modernas, se caracterizan porque el tratamiento al que se somete la leche de vaca no es tan fuerte como en las FeH, de manera que el tamaño molecular de los péptidos en este caso oscila entre 2000 y 10000 Da. La alergenicidad de estos péptidos es algo superior, pero a cambio diferentes estudios demuestran que estas fórmulas sí inducen tolerancia

oral. Así, un estudio en el que se comparaban una fórmula infantil convencional, con una FeH y otra FpH, mostró que las dos fórmulas hidrolizadas produjeron menos síntomas que la fórmula convencional. En cuanto a la inducción de tolerancia oral, la FpH fue mejor que la FeH (Oldaeus G y col, 1997).

Sin embargo otros trabajos muestran casos de reacciones alérgicas frente a FpH (Zeiger RS, 1990), de ahí que este tipo de fórmulas no sean recomendadas en niños con APLV diagnosticada (Businco L y col, 1993). A pesar de ello, las FpH pueden ser de gran ayuda en niños que no hayan mostrado síntomas de alergia, pero que por antecedentes familiares, tienen un alto riesgo de padecerla (Exl BM y col, 2001).

4.1.4. Prevención de la APLV: posible papel de la leche de cabra:

La prevención de la enfermedad atópica a través de la dieta ya fue recomendada en 1936 por Grulee y Sanford. Según los expertos en nutrición infantil, son varias las razones por las que, se hace necesaria la prevención de la APLV (Exl BM y col, 2001):

1º. Se trata de una patología frecuente en niños de hasta 2 años de edad, con una incidencia de 2-6% (Hill DJ, 1996).

2º. La leche de vaca representa la fuente de calcio más importante en nuestra sociedad, especialmente para niños, y su eliminación de la dieta por problemas de intolerancia podría generar deficiencias importantes.

3º. La proteína de la leche de vaca está presente en muchos productos, por lo que es difícil de eliminar de la dieta.

4º. Desde un punto de vista económico, la prevención supone un coste inferior que el tratamiento.

Por estas razones es importante desarrollar un programa de prevención primaria, secundaria o terciaria, en función del estado en el que se encuentre la enfermedad:

- prevención primaria: encaminada a evitar la sensibilización inicial del recién nacido, principalmente mediante la inducción de tolerancia oral frente a las proteínas de la leche de vaca.
- prevención secundaria: dirigida a individuos ya sensibilizados frente a la proteína de la leche de vaca, con o sin síntomas.

- prevención terciaria: trata de prevenir posteriores problemas en niños que han sufrido alergia crónica.

Posible papel preventivo de la leche de cabra en la APLV

La mejor medida de prevención de la APLV es la alimentación exclusiva con leche materna durante los primeros seis meses de vida (Saarinen U y col, 1995). Sin embargo esta medida no es posible siempre, por lo que es necesario buscar alternativas a la leche de vaca, para prevenir la APLV.

La leche de cabra ha sido propuesta como sustituto de la de vaca, ya que algunos niños alérgicos a la proteína bovina la toleran (Webber SA y col, 1989). Sin embargo existen estudios que demuestran que los niños con APLV también están sensibilizados frente a las proteínas de la leche de cabra (Carroccio A y col, 1999). Esto es debido a la reactividad cruzada, ya que las proteínas de ambas especies tienen una elevada similitud y los anticuerpos frente a proteínas bovinas reconocen también las proteínas caprinas. Por tanto, la leche de cabra no parece ser una alternativa adecuada para niños con APLV.

Muy pocos estudios han analizado la alergenicidad *per se* de la leche de cabra, a pesar de que el contenido en α 1-caseína, uno de los principales alérgenos de la leche de vaca, es inferior en la leche de cabra (Bellioni-Businco B y col, 1999). Así, la leche de cabra podría ser menos alérgica que la de vaca y podría ejercer un papel importante en la prevención primaria de la APLV, es decir, en niños que no estén sensibilizados frente a la leche de vaca.

Recientemente se ha publicado un artículo de posicionamiento de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2004), en el cual se recoge el resultado de un estudio en recién nacidos sanos en el que se comparan fórmulas a base de leche de vaca y de cabra. Se compara una fórmula a base de leche de cabra sin modificar con una fórmula de leche de vaca desmineralizada y con una proporción C/PL de 40/60. Este artículo concluye que no hay datos suficientes que evidencien que la leche de cabra no modificada es mejor que la de vaca modificada para las fórmulas infantiles. A pesar de ello en el estudio citado la leche de cabra dio una incidencia de reacciones adversas ligeramente inferior a la de vaca, así como una proporción significativamente menor de casos de estreñimiento.

4.2. **Enterocolitis necrosante (ECN): la enfermedad inflamatoria intestinal del recién nacido**

La enterocolitis necrosante (ECN) es una enfermedad neonatal que afecta al tracto gastrointestinal y que se define como “necrosis isquémica-inflamatoria del intestino del neonato”. Afecta con mayor frecuencia a los niños prematuros y de bajo peso al nacer, siendo su incidencia del 11% en neonatos de menos de 1500 g de peso (Dani C y col, 2002).

Los síntomas de la ECN son variables y muy similares a los de la sepsis neonatal: intolerancia a los alimentos, shock, peritonitis y en casos graves puede provocar la muerte. De hecho, la ECN sigue siendo una de las principales causas de muerte de los neonatos prematuros, con un 20%-40% de mortalidad en esta población (Precioso AR y col, 2002).

4.2.1. Factores de riesgo en la ECN:

La etiología de la ECN no está del todo clara, pero generalmente es considerada una enfermedad multifactorial. El factor de riesgo más importante es la inmadurez intestinal, que caracteriza a los neonatos prematuros y de bajo peso al nacer. Otros factores que influyen en la etiología de esta enfermedad son: la hipoxia y/o isquemia intestinal, así como la nutrición y la capacidad de ésta para potenciar la colonización intestinal por bacterias (Crissinger KD, 1995) (figura 4-3).

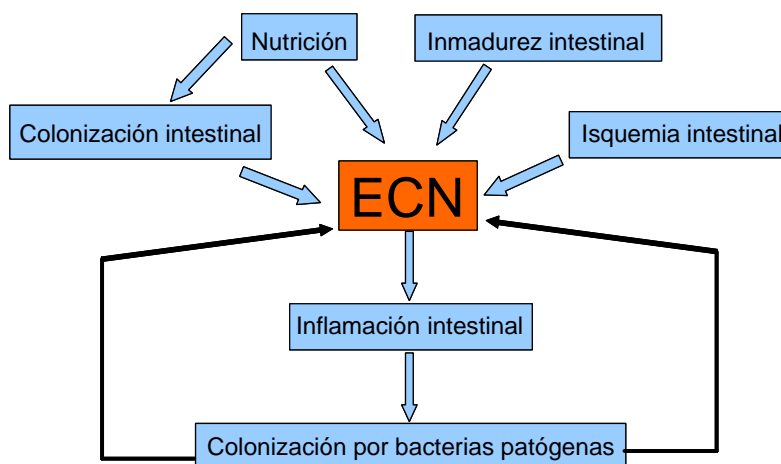


Figura 4-3. Factores de riesgo en la enterocolitis necrotizante (ECN).

La ECN como proceso inflamatorio

La asociación de estos factores de riesgo puede disparar una inflamación local con liberación de mediadores que desencadenan la ECN. Entre ellos, el factor activador de plaquetas (FAP) parece ser uno de los principales desencadenantes de la patología (Gonzalez-Crussi F y col, 1983). Se trata de un fosfolípido producido por células inflamatorias, plaquetas, células endoteliales y algunas bacterias (*E.coli*), que tiene la capacidad de generar radicales libres que provocan daño a nivel intestinal.

Como consecuencia de este daño tisular, se produce un aumento de la permeabilidad intestinal que conduce a la infiltración de determinadas células, en un primer momento neutrófilos que son los primeros en llegar al lugar de la inflamación. Estas células, presentan una elevada actividad mieloperoxidasa (MPO), que genera nuevos radicales libres que mantienen el daño tisular.

Así el proceso inflamatorio agudo va evolucionando hacia un proceso crónico, caracterizado por la infiltración de macrófagos y de sus precursores, los monocitos. Estas otras células producen gran cantidad de mediadores químicos de la inflamación como citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , etc), radicales libres de oxígeno y enzimas proteolíticas como las metaloproteasas (MMP). Todos estos factores, junto con la inmadurez intestinal del recién nacido, contribuyen a perpetuar el daño intestinal característico de la ECN.

4.2.2. Papel de la nutrición del neonato en la ECN:

La prevención de la inmadurez intestinal y de la isquemia, aunque sería deseable, no siempre es posible. Sin embargo la nutrición del neonato, que está asociada con la ECN en un 90% de los casos, sí es un factor de riesgo sobre el que se puede actuar, para tratar de prevenir la ECN (Dani C y col, 2002).

De hecho, estudios recientes han demostrado que la introducción temprana de pequeños volúmenes de nutrientes, favorece la maduración y la colonización bacteriana normal del intestino (Berseth CL, 1995).

La leche humana y su papel protector frente a la ECN

El tipo de leche que consume el neonato parece tener una gran importancia en la prevención de la ECN. Así, los niños alimentados exclusivamente con leche humana tienen menos riesgo de padecer la enfermedad que aquellos alimentados con fórmulas o con una alimentación mixta (fórmula y leche humana simultáneamente) (Lucas A y col, 1990). Un dato que confirma el papel protector de la leche humana en la ECN es la menor incidencia de esta patología en los países en los que la lactancia materna está más extendida. Un estudio hecho en Italia, donde más del 85% de los neonatos son alimentados con leche humana, mostró una incidencia del 1,7% frente al 10% en EEUU (Rubaltelli FF y col, 1998).

Los mecanismos de este papel protector de la leche humana no han sido del todo establecidos. Como ya se ha comentado (ver capítulo 1) la leche materna contiene compuestos con propiedades antimicrobianas (oligosacáridos, lactoferrina, IgA,...), antiinflamatorias (EGF, antioxidantes,...) e inmunomoduladoras (citoquinas, nucleótidos,...) que podrían actuar como protectores frente a la ECN.

Además está demostrada la presencia del enzima FAP-hidrolasa en la leche humana, lo que favorecería la inactivación del FAP, que como ya se ha mencionado es uno de los mediadores más importantes de la ECN.

Probióticos y su papel en la ECN

Otro factor que podría contribuir al papel protector de la lactancia materna frente a la ECN, es el reciente descubrimiento de bacterias ácido-lácticas en la leche humana (Martín R y col, 2004). Como ya se ha comentado, la leche humana, por su contenido en bacterias y oligosacáridos, favorece la colonización intestinal por bacterias lácticas y bifidobacterias, lo que supone una importante defensa frente a esta enfermedad.

La ECN es muy común en niños que ingresan en la unidad de cuidados intensivos de los hospitales (Dani C y col, 2002). Se cree que esto es debido en parte a que la colonización intestinal de estos niños es diferente a la de niños normales. Así, los métodos utilizados en estas unidades, principalmente la estancia en incubadoras y los tratamientos con antibióticos favorecen el

crecimiento de enterobacterias y estafilococos, que son patógenos habituales causantes de infecciones nosocomiales y pueden predisponer al neonato a sufrir la ECN (Kosloske AM y col, 1994).

Se ha sugerido que este crecimiento de patógenos puede ser prevenido potenciando la colonización por probióticos, bien mediante la administración de estas bacterias o bien con prebióticos, azúcares que favorecen su crecimiento de forma selectiva. Estas bacterias compiten con las patógenas por los sitios de unión y por los nutrientes, y además producen gran cantidad de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas, reuterina, peróxido de hidrógeno, etc...) (ver apartado 1.3).

Un estudio reciente ha demostrado que la administración de *Lactobacillus* GG ($6 \cdot 10^9$ cfu/día) es efectiva en la reducción de la ECN en niños pretérmino, después de siete días de suplementación (Dani C y col, 2002).

Estos resultados coinciden con los de otro estudio en el que se observó que la administración diaria de *L.acidophilus* ($2,5 \times 10^7$ cfu) y *Bifidobacterium infantis* ($2,5 \times 10^7$ cfu) fue efectiva en la reducción de la incidencia de la ECN en neonatos ingresados en una unidad de cuidados intensivos (Hoyos, 1999).

Ambos estudios, aunque preliminares, parecen confirmar el posible papel preventivo de los probióticos en la ECN. Por tanto, la administración de estas bacterias o de sustancias que pudieran favorecer su crecimiento, podría ser una medida nutricional a tener en cuenta en la prevención de la ECN.

4.3. Otras enfermedades relacionadas con la nutrición del recién nacido

4.3.1. Diarrea por infección gastrointestinal:

Debido a la inmadurez del sistema inmunológico asociado a la mucosa intestinal, el neonato es muy susceptible de sufrir infecciones gastrointestinales. Éstas son la principal causa de diarrea en el recién nacido y siguen siendo un problema frecuente, no sólo en países menos desarrollados (en los que son una causa importante de mortalidad infantil), sino también en los países con un nivel socio-sanitario superior. En estos últimos los principales factores que afectan a una mayor severidad del cuadro son la lactancia artificial, las guarderías y los ingresos en hospitales (Ballabriga A y col, 2001).

Los microorganismos más frecuentes causantes de estas infecciones incluyen enterobacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis typhi*) y algunos virus, principalmente el rotavirus humano (Ballabriga A y col, 2001).

En cuanto a los síntomas que provocan, dependen principalmente del lugar de invasión del microorganismo. Si es a nivel del intestino delgado, la diarrea suele asociarse con falta de apetito, náuseas y, a veces, vómitos. En los casos de invasión de colon, las pérdidas de líquidos, sal y nutrientes a causa de la diarrea son muy grandes, por lo que puede aparecer deshidratación y malnutrición.

Como medidas de prevención, la lactancia materna es la más efectiva, ya que está ampliamente descrita la menor incidencia en niños amamantados en comparación con los alimentados con fórmulas (Victoria GG y col, 1987). Los componentes protectores de la leche materna, ya han sido ampliamente comentados en el apartado 1.

La suplementación de las fórmulas infantiles con probióticos también ha demostrado ser eficaz en la reducción de la incidencia de diarrea por infección gastrointestinal (Ballabriga A y col, 2001).

4.3.2. Diarrea por intolerancia a la lactosa:

La intolerancia a la lactosa se produce como consecuencia de una deficiencia en la enzima lactasa, capaz de hidrolizar la lactosa en glucosa y galactosa. Al no ser digerida, la lactosa queda en el intestino actuando como elemento osmótico que provoca la entrada de agua a nivel intestinal. Además la flora bacteriana fermenta la lactosa no digerida, generando ácido láctico y gases que provocan dolor abdominal (Rivero M, 2003).

El tratamiento nutricional de esta deficiencia pasa por eliminar de la dieta las fórmulas convencionales y sustituirlas por fórmulas especiales bajas en lactosa (ver apartado 2.3.1). Aunque hay muchos niños que toleran productos lácteos como el queso o el yogur en los que la lactosa ha sido parcialmente hidrolizada por bacterias fermentativas. También existe lactasa comercial que se puede administrar al mismo tiempo que el alimento que contiene lactosa (Rivero M y col, 2003).

4.3.3. *Diabetes mellitus* tipo I:

La *diabetes mellitus* tipo I es la enfermedad crónica más frecuente en la infancia y la adolescencia (Rivero M, 2003). La alimentación durante las primeras etapas de la vida parece ser clave en el posterior desarrollo de esta patología. Así la llamada “hipótesis de la leche” sugiere que la exposición temprana del neonato a la leche de vaca puede aumentar el riesgo de padecer la diabetes tipo I (Fraser WS y col, 1995).

Esta hipótesis se basa en diferentes estudios que asocian la lactancia artificial con el desarrollo de la diabetes (Borch-Johnsen K y col, 1984). Además un 100% de los nuevos casos de diabetes tipo I diagnosticados presentan altos niveles de IgG frente a la albúmina bovina. Debido a la existencia de reactividad cruzada, estos anticuerpos son capaces de reconocer un antígeno de la proteína β de los islotes pancreáticos (Dosch HM y col, 1991). Según esto, el consumo temprano de leche de vaca desencadenaría una respuesta autoinmune que llevaría a la destrucción de los islotes pancreáticos originando la diabetes tipo I.

Por la misma razón se ha relacionado la introducción temprana de la lactancia artificial con una mayor incidencia de otras enfermedades autoinmunes, principalmente la esclerosis múltiple (Malosse D y col, 1992).

En definitiva, la salud del neonato, del niño e incluso del adolescente depende en gran medida de la nutrición durante el periodo postnatal. La lactancia materna es el mejor alimento en este sentido, pero es muy importante buscar nuevos ingredientes y alternativas a la leche de vaca, así como demostrar su funcionalidad para los casos en los que la lactancia artificial es imprescindible.

Objetivos

La investigación actual en el campo de la nutrición infantil se centra en la búsqueda de nuevos ingredientes que mejoren las fórmulas infantiles existentes y consigan efectos similares a los que se observan en los niños alimentados con leche humana.

En el presente trabajo se ha investigado la utilización de la leche de cabra como fuente de estos nuevos ingredientes funcionales para la elaboración de fórmulas infantiles. Tomando como modelo la leche humana, se ha pretendido proponer soluciones a algunos de los problemas que plantean las fórmulas infantiles que actualmente existen en el mercado.

Con este fin, los objetivos planificados para la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Evaluar el efecto de diferentes modificaciones en el componente proteico de las fórmulas infantiles con el fin de prevenir la APLV, así como estudiar la influencia de esta patología sobre otros fenómenos de alergia posteriores. Concretamente nuestra investigación se centró en los siguientes puntos:

- 1.1. Analizar la alergenicidad de la proteína de la leche de cabra.
- 1.2. Influencia de la APLV sobre posteriores fenómenos de sensibilización frente a otros alergenicos.
- 1.3. Evaluar el efecto sobre la alergenicidad de la leche de vaca de una modificación en la proporción caseínas/proteínas del lactosuero.
- 1.4. Analizar la alergenicidad de un producto obtenido mediante hidrólisis de las proteínas de la leche de vaca por bacterias probióticas.

2. Comparar los efectos de las leches de vaca y cabra sobre el sistema inmunitario de ratones sanos.

3. Evaluar la actividad funcional de los oligosacáridos de leche de cabra a nivel gastrointestinal. Con este objetivo se investigaron los siguientes puntos:

- 3.1. Efecto de estos azúcares sobre la flora bacteriana intestinal, estudiando posibles efectos inhibidores de bacterias patógenas, así como su capacidad para favorecer el crecimiento de bacterias probióticas.
 - 3.2. Capacidad de absorción a nivel de intestino.
 - 3.3. Efecto sobre un modelo animal de inflamación intestinal, ya que este proceso inflamatorio es frecuente en neonatos que padecen ECN.
4. Búsqueda de péptidos en la leche de cabra con la capacidad de ser absorbidos a nivel intestinal y estudio de su bioactividad, principalmente sobre el sistema inmunitario.

Metodología

5. ANÁLISIS DE LA ALERGENICIDAD DE LA LECHE DE VACA.

La mayoría de reactivos utilizados en este y en los demás estudios descritos en el presente trabajo fueron proporcionados por *Sigma Chemical Co.* En el caso de reactivos suministrados por otras casas comerciales, éstas se indican entre paréntesis.

La leche de vaca fue proporcionada por Puleva Food S.A., mientras que la de cabra, de la raza Murciano-Granadina, fue suministrada por la Granja Experimental Ganadera de la Diputación Provincial de Granada.

Los animales utilizados en los diferentes estudios fueron proporcionados por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Granada, salvo que se indique lo contrario. En todos los casos se siguieron las directrices para el cuidado y uso de animales de laboratorio establecidas por el protocolo de Helsinki. Los diseños experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

5.1. Análisis comparativo de la alergenicidad de las leches de vaca y cabra

Con el objetivo de analizar y comparar la alergenicidad de las leches de vaca y cabra, se utilizó un modelo animal de alergia a las proteínas de la leche, consistente en una fase de sensibilización a las proteínas lácteas y una segunda fase de inducción de los síntomas por la administración de una dosis de choque (Xiu-min Li y col, 1999). En ambos casos las proteínas objeto de estudio se administraron por vía oral.

5.1.1. Animales y diseño experimental:

Se utilizaron ratones hembra Balb/C de 3 semanas de edad, es decir, inmediatamente después del destete, que se mantuvieron en un ambiente de temperatura y luz controladas (ciclo de 12h de luz/oscuridad a 22°C) durante todo el experimento, y recibieron una dieta estándar para ratones.

Este y todos los estudios en animales presentados en este trabajo fueron realizados siguiendo las directrices para el cuidado y uso de los animales de

laboratorio establecidas por el protocolo de Helsinki y bajo la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

Los animales fueron sensibilizados frente a las proteínas de vaca y cabra mediante la administración por sonda oral de 6 dosis (una por semana) de dichas proteínas disueltas en tampón fosfato salino (PBS: NaCl 0,13M; Na₂HPO₄ 0,07M; NaH₂PO₄ 0,03M; pH 7,2) junto con toxina colérica, que actúa como adyuvante al estimular la respuesta inmunológica de tipo T_H2. Para ello se dividieron en 4 grupos (n=13) según el siguiente esquema (figura 5-1):

- **Grupo vaca (V):** sensibilizado con proteínas de leche de vaca (PLV) 1mg/g de peso corporal, junto con 0,3 µg/g de peso corporal de toxina colérica.
- **Grupo cabra (CB):** estos animales recibieron 1mg/g de proteínas de leche de cabra (PLC) junto con 0,3 µg/g de toxina colérica.
- **Grupos control:** para evaluar los efectos del vehículo (PBS) y de la toxina colérica, un grupo de ratones (**C**) recibió PBS sólo, mientras que otro grupo (**CT**) recibió PBS junto con 0,3 µg/g de toxina colérica.

Una semana después de la última dosis los animales fueron sometidos a 2 dosis orales de choque separadas 30 minutos, con objeto de desencadenar los síntomas típicos de la alergia:

- Grupo (V): 60 mg de PLV separadas en dos dosis de 30 mg.
- Grupo (CB): 60 mg de PLC separadas en dos dosis de 30 mg.
- Grupos control (C y CT): 60 mg de PLV separadas en dos dosis de 30 mg. (Trabajos previos de nuestro laboratorio habían demostrado que los grupos control pueden someterse a dosis de choque con PLV o PLC con resultados idénticos).

Finalmente, 30 minutos después de la última dosis de choque, los animales fueron sacrificados por anestesia profunda mediante la administración de 50 mg/kg de peso corporal de pentotal sódico. La sangre fue extraída por punción cardíaca y recogida en tubos tratados con ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA). Además el bazo y el intestino de todos los ratones fueron extraídos y pesados.

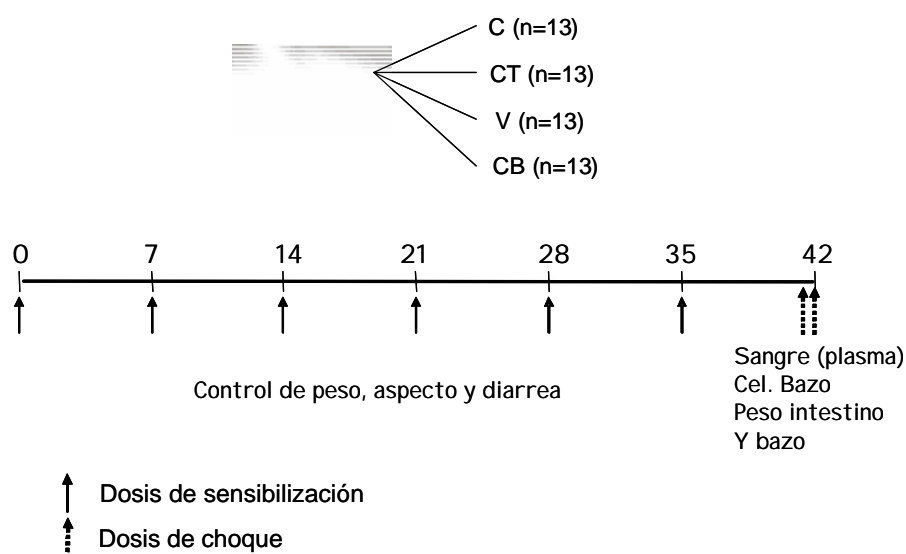


Figura 5-1. Esquema del diseño experimental del modelo de alergia a las proteínas de la leche de vaca y de cabra.

5.1.2. Evaluación de los síntomas:

El peso y la conducta de los animales fue evaluado semanalmente durante todo el estudio. La presencia de diarrea fue considerada como síntoma de interés, por lo que también fue evaluada semanalmente. Aquellos animales en los que se observó la presencia de diarrea dos veces consecutivas fueron considerados positivos.

Por otra parte, inmediatamente después de la segunda dosis de choque, los animales fueron observados durante 30 minutos y recibieron una puntuación en función de los síntomas que presentaban:

- 0: no síntomas.
- 1: picor y enrojecimiento alrededor de la nariz y cabeza.
- 2: ojos llorosos y pelo erizado.
- 3: actividad disminuida y ritmo respiratorio ligeramente acelerado.
- 4: respiración forzada y ruidosa.
- 5: muerte.

5.1.3. Determinación de parámetros plasmáticos:

Medida de IgG1 antígeno-específicas

La sangre se centrifugó (3500 rpm, 4°C, 10 minutos) y el suero se congeló a -80 °C en diferentes alícuotas. Para la determinación de las IgG1 antígeno-específicas se utilizó la técnica conocida como *Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) tal y como se describe a continuación.

Una placa de 96 pocillos se cubrió con una solución a 20 µg/ml de PLV o PLC disueltas en una solución de Na₂CO₄ 0,5M a pH=9,6. Después de 12 horas de incubación a 4°C los pocillos se lavaron 3 veces con un tampón de lavado (50mM Tris, 0,14M NaCl, 0,05% Tween 20, pH=8,0) y se bloquearon con la solución de bloqueo compuesta por: 50mM Tris, 0,14M NaCl, 1% de albúmina bovina sérica (BSA), pH=8,0. A continuación, las alícuotas de plasma, previamente diluidas 1/10, se adicionaron a los pocillos y se incubó la placa 1h a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados de nuevo 3 veces, se añadió el anticuerpo de captura, anti-IgG1 de ratón conjugado con peroxidasa (*Bethyl laboratories*) diluido 1/4000 en el tampón de lavado adicionado de 1% de BSA y se incubó 1 hora más a temperatura ambiente. Finalmente los pocillos se lavaron 3 veces más, se añadieron 100µl/pocillo del reactivo de revelado, 3,3'-5,5'-tetrametil-bencidina (TMB) y se incubó la placa 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Para parar la reacción se utilizaron 100µl/pocillo H₂SO₄ 0,1N y se leyó la absorbancia a 450nm con un filtro de referencia de 620nm. Cada punto se hizo por duplicado y los resultados se expresaron como la media ± error estándar medio (EEM) de los valores obtenidos para todos los animales de cada grupo.

Determinación de los niveles de histamina

Los niveles plasmáticos de histamina se determinaron mediante un método de ELISA de competición, siguiendo las instrucciones del fabricante (*IBL laboratories*).

Determinación de otras inmunoglobulinas y citoquinas en plasma

Para la determinación de los niveles plasmáticos de inmunoglobulinas y citoquinas se utilizaron métodos de ELISA comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (*Biosource* y *Bethyl laboratories*). Las diluciones del plasma y de los anticuerpos utilizados se resumen en la tabla 5-1.

Inmunoglobulinas	plasma	anticuerpo 1^o	anticuerpo 2^a
IgG	1	1/100	1/100000
IgG1	1	1/100	1/100000
IgE	1	1/100	1/100000
Citoquinas	plasma	anticuerpo 1^o	anticuerpo 2^a
IL-4	1	1/800	1/8000
IL-10	1	1/800	1/8000

Tabla 5-1. Diluciones utilizadas en los métodos comerciales de ELISA con muestras de plasma.

5.1.4. Cultivo de linfocitos procedentes del bazo:

El bazo de los ratones fue extraído inmediatamente tras su sacrificio y homogenizado en medio de cultivo completo (DMEM alto en glucosa, adicionado de 10% de suero fetal bovino y 1% de una mezcla de penicilina y estreptomycin). Después de centrifugar el homogenado (1500 rpm, 5 minutos, 4°C), los eritrocitos fueron eliminados mediante la incubación en una solución de lisis (NH₄Cl 1,7M; KHCO₃ 0,12M; EDTA 0,009M) durante 15 minutos a 4°C. El resto de células, principalmente linfocitos, se cultivaron en diferentes condiciones para analizar su proliferación y el perfil de citoquinas que producían. Para ello se utilizó el mismo medio anterior y se incubaron las células a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Ensayo de proliferación

Este tipo de ensayo se basa en la necesidad de incorporar nucleótidos por parte de las células que se encuentran en división. Así, las células se cultivan en presencia de un estímulo que induce la proliferación, y de timidina tritiada

(timidina-³[H]), para posteriormente cuantificar la cantidad de radioactividad incorporada por las células. Los linfocitos que incorporasen mayor radioactividad, habrían proliferado más, es decir, tendrían un mayor grado de sensibilización frente al estímulo.

Las células procedentes del bazo se cultivaron en placas de 24 pocillos (2x10⁶ células/pocillo) con 1 ml de medio de cultivo/pocillo. Los linfocitos procedentes de cada ratón se dividieron en 3 pocillos en las siguientes condiciones (figura 5-2):

- basal: ausencia de proteínas.
- PLV: en presencia de PLV (100µg/ml).
- PLC: en presencia de PLC (100µg/ml).

Junto con la proteína se añadió timidina tritiada a cada pocillo (1µCi/ml) y la placa se incubó durante 48h a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Transcurrido este tiempo las células se centrifugaron (1500 rpm, 5 minutos) para eliminar los sobrenadantes. A continuación las células se fijaron con 500µl de metanol 70% a 4°C durante 1 hora. Finalmente, tras 3 lavados con ácido tricloroacético al 10% en frío, las células se lisaron con una solución de lauril-sulfato-sódico (SDS) al 1% y 0,3M de NaOH a temperatura ambiente. La radioactividad se midió en un contador de centelleo 2100 Tri-Carb Packard.

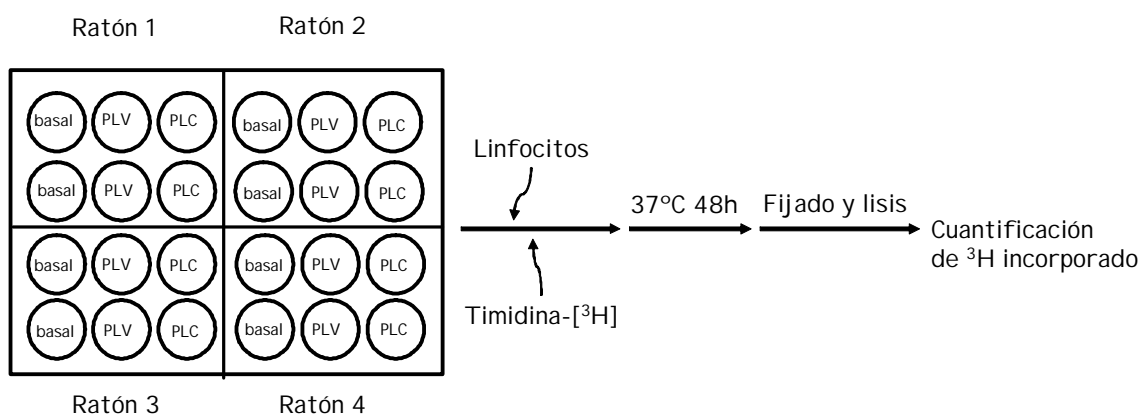


Figura 5-2. Esquema del ensayo de proliferación de linfocitos obtenidos del bazo de los ratones.

Análisis de la producción de citoquinas

Para este tipo de ensayo los linfocitos de cada ratón se cultivaron en placas de 6 pozos (10×10^6 células/pozo) en 5 ml de medio y se incubaron durante 24h en presencia de concanavalina A (ConA, $5 \mu\text{g/ml}$), un mitógeno específico de los linfocitos T. De esta manera, si los linfocitos estaban desplazados hacia una respuesta T_H2 , pro-alérgica producirían un determinado perfil de citoquinas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se determinaron los niveles de IgE, IgG, IgG1, interleuquina-12 (IL-12), IL-4, IL-10, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interferón-gamma (IFN- γ). Para ello se utilizaron métodos de ELISA comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (*Bethyl laboratories* y *Biosource*). Las diluciones utilizadas están recogidas en la tabla 5-2.

Inmunoglobulinas	sobrenadante	anticuerpo 1º	anticuerpo 2ª
IgG	1	1/100	1/100000
IgG1	1	1/100	1/100000
IgE	1	1/100	1/100000
Citoquinas	sobrenadante	anticuerpo 1º	anticuerpo 2ª
IL-4	1	1/800	1/8000
IFN-g	1	1	1/100
IL-10	1	1/800	1/8000
IL-12	1	1/800	1/8000
TNF-a	1/4	1/100	1/8000

Tabla 5-2. Diluciones utilizadas para los métodos comerciales de ELISA en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos.

5.1.5. Análisis de la expresión génica por RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*):

Una vez recogidos los sobrenadantes, las células del ensayo anterior se utilizaron para la extracción de ARNm con objeto de analizar la expresión génica. El ARNm total de los linfocitos derivados de bazo estimulados con ConA fue aislado utilizando el reactivo Trizol (*Invitrogen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa (síntesis de ADNc a partir de ARNm) se llevó a cabo con la Transcriptasa Reversa AMV (*Roche*) siguiendo un método previamente publicado (Soler C y col, 2001). El cDNA resultante fue usado para la reacción en cadena de la polimersa (PCR) según el mismo método (Soler C y col,

2001). Una vez amplificado, 25 µl del producto fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2% y las bandas de ADN se visualizaron por tinción con bromuro de etidio e irradiación ultravioleta.

La secuencia de los cebadores de ratón utilizados (*MGW-Biotech*) está recogida en la tabla 5-3.

	Sentido	Antisentido
IFN-g	5'-TGGAGGAACTGGCAAAAGGATGGT-3'	5'-TTGGCACAATCTCTTCAC-3'
IL-4	5'-ACGAGGTCACAGGAGAAGGGA-3'	5'-GGAGCAGCTTATCGATGAATC-3'
b-actin	5'- TGAATCCTGTGGCATCC-3'	5'- AACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'

Tabla 5-3. Secuencias de los cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica por RT-PCR.

5.1.6. Análisis estadístico:

La significación estadística ($p < 0,05$) se calculó mediante el método del análisis de varianzas (ANOVA) de una vía y los *test a posteriori* adecuados a cada parámetro: *test* de Fisher para los valores paramétricos (concentración de citoquinas, proliferación de linfocitos) y *test* de Mann-Whitney para los no paramétricos (puntuación de los síntomas, relación peso intestino/peso corporal y número de ratones con diarrea). Finalmente, el *test* de Spearman se utilizó para el análisis estadístico de las correlaciones entre IgG1-específica, concentración de histamina y puntuación de los síntomas. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS (versión 12.0). Los análisis de las diferentes muestras se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm error estándar medio (EEM).

5.2. Evaluación del efecto de la relación caseínas/proteínas del lactosuero sobre la alergenidad de la leche de vaca

La relación caseínas/proteínas del lactosuero (C/PL) de la leche humana es 40/60, muy diferente a la de las leches de vaca y cabra que es aproximadamente 80/20. Por otra parte, uno de los principales alérgenos de la leche de vaca es la α 1-caseína, que es el componente mayoritario de la fracción

de caseínas de esta leche. Así, parece interesante evaluar la alergenicidad de una leche de vaca con una menor proporción de caseínas.

Con este objetivo, se utilizó el mismo modelo animal del apartado 5.1 para comparar la alergenicidad de dos leches de vaca con diferentes proporciones C/PL.

5.2.1. Modificación de la proporción C/PL de la leche de vaca:

Con objeto de modificar la proporción C/PL de la leche de vaca, 50ml de leche de vaca desnatada se mezclaron con 50ml de una solución de lactosa a 50mg/ml. Así se mantuvo la concentración de lactosa, que puede ser un componente determinante para la permeabilidad intestinal. A continuación se adicionaron 1,78g de un concentrado de proteínas del lactosuero (*Arla foods*), de manera que la leche resultante tenía una relación C/PL de 40/60.

Las concentraciones de proteínas totales de la leche de vaca normal y de la modificada fueron medidas mediante el método de Kjeldhal (*Association for Oficial Analytical Chemists*, 1980). Para analizar las porciones de caseínas y proteínas del lactosuero de ambas leches se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE), como se describe más adelante (ver 5.2.2).

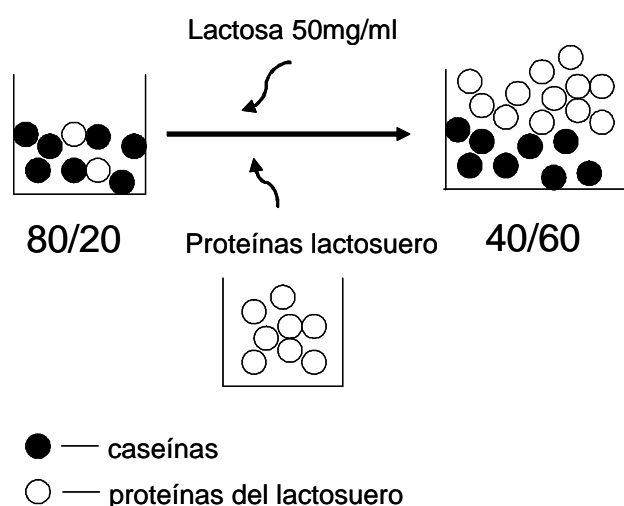


Figura 5-3. Modificación de la relación C/PL de la leche de vaca.

5.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida se utilizó el sistema *Miniprotean* (*Bio-Rad*). La concentración del gel fue del 12% y se utilizó un protocolo previamente publicado por Sambrook y col (1989). Se sometieron a electroforesis 25µg de proteínas que se resuspendieron en solución de Laemli (Tris-HCl 50mM a pH 6,8; ditiotretitol 100mM, SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 10%) y antes de cargarlas en el gel se calentaron 5 minutos a 95°C con objeto de desnaturalizar las proteínas. Una vez concluida la electroforesis, el gel se fijó en una mezcla de metanol y ácido acético (50:10). Para visualizar las proteínas, el gel se tiñó con azul de coomasie al 0,25%, utilizando una mezcla de metanol y ácido acético (10:10) como solución de lavado. Una vez desteñado el gel se secó al vacío entre papel de celofán.

5.2.3. Animales y diseño experimental:

El diseño experimental en este caso fue idéntico al del apartado anterior (ver apartado 5.1.1), con una primera fase de sensibilización, seguida de la dosis de choque. En este caso los grupos de animales utilizados fueron los siguientes (n=8 por grupo):

- **Grupo vaca (V):** sensibilizado con proteínas de leche de vaca natival (relación C/PL de 80/20) 1mg/g de peso corporal, junto con 0,3 µg/g de peso corporal de toxina colérica.
- **Grupo vaca modificada (VM):** estos animales recibieron 1mg/g de proteínas de la leche de vaca con la relación C/PL de 40/60, junto con 0,3 µg/g de toxina colérica.
- **Grupo control:** como ya se había comprobado en el apartado anterior, que el vehículo por sí solo (PBS) no provocaba ningún efecto en los ratones, en este experimento se incluyó únicamente el control con toxina colérica (**CT**) que recibió PBS junto con 0,3 µg/g de toxina colérica.

Como dosis de choque se administraron PLV (30 mg/ratón) con una relación C/PL de 80:20, en dos dosis separadas 30 minutos, de la misma forma que en el experimento anterior (ver apartado 5.1.1).

5.2.4. Parámetros analizados:

En este experimento se analizaron los siguientes parámetros, siguiendo los mismos protocolos descritos en el apartado anterior:

- Evaluación de los síntomas, mediante el sistema de puntuación ya descrito (ver 5.1.2).
- Niveles plasmáticos de IgG1 específica frente a PLV y de histamina (ver 5.1.3).
- Ensayo de proliferación de linfocitos procedentes de bazo, usando como estímulo PLV (100 µg/ml) (ver 5.1.4).

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo de la misma forma descrita en el apartado anterior (ver 5.1.5).

5.3. Influencia de la APLV en posteriores fenómenos de alergia

5.3.1. Animales y diseño experimental:

En este estudio se pretendía hacer a los ratones alérgicos frente a las PLV o PLC y posteriormente comprobar si durante la reacción alérgica el contacto con otro antígeno desencadenaba un nuevo proceso de sensibilización.

El modelo animal utilizado fue el mismo descrito en el apartado 5.1. Se utilizaron ratones Balb/C (n=16) y los mismos grupos exceptuando el control sin toxina colérica, puesto que ya se había demostrado que el vehículo por sí solo no provocaba ningún efecto. Una vez concluida la fase de sensibilización frente a las proteínas lácteas, a todos los ratones (n=16) se les administró una primera dosis de choque con PLV y PLC, como en los modelos descritos anteriormente. Tras 30 minutos a la mitad de los ratones (n=8 de cada grupo) se les administró una segunda dosis de choque y se sacrificaron. Este primer grupo de animales se utilizó para comprobar si los ratones se habían sensibilizado frente a las proteínas lácteas.

La otra mitad de los animales (n=8 por grupo) se sometieron a una segunda dosis oral de choque con proteínas lácteas a las que se adicionó un nuevo alérgeno, la ovoalbúmina (OVA). Con esta segunda dosis de choque se pretendía comprobar si los ratones se sensibilizaban también frente a OVA. Así esta segunda dosis de choque estaba compuesta por:

- Grupo **CT**: OVA (1mg/g).
- Grupo **V**: PLV (1mg/g) y OVA (1mg/g).
- Grupo **CB**: toxina colérica (0,3 µg/g), junto con PLC (1mg/g) y OVA (1mg/g).

Para comprobar si los ratones se habían sensibilizado frente a OVA, transcurridos 15 días se les administró por vía intraperitoneal, la misma dosis de choque a todos los grupos, consistente en una solución de OVA en Al(OH)₃ 0,1M a razón de 1mg de OVA/g de peso corporal. Con esta dosis, si los ratones estaban sensibilizados frente a OVA, se desencadenarían los síntomas de la reacción alérgica.

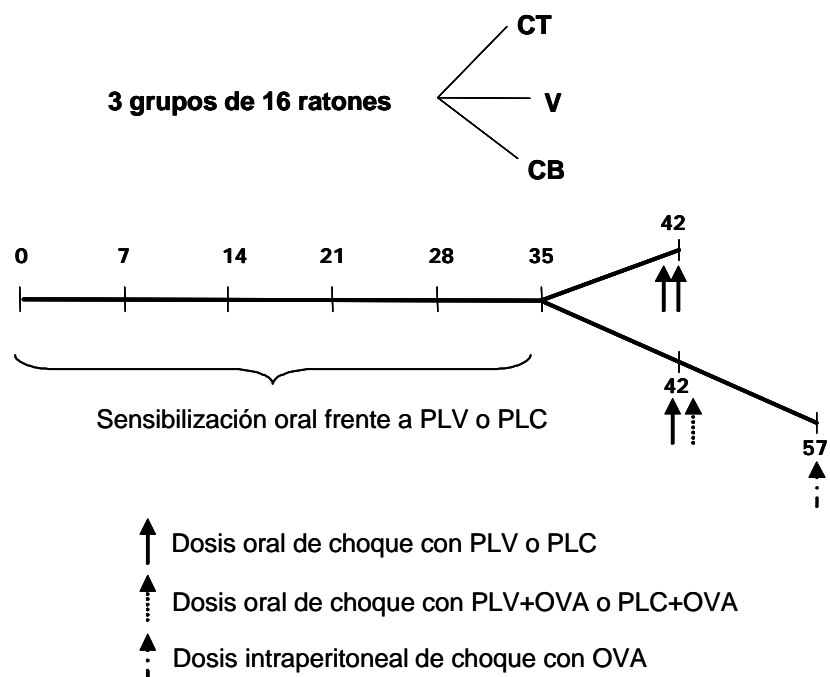


Figura 5-4. Esquema del modelo animal utilizado para evaluar los efectos de la APLV en posteriores fenómenos de alergia.

5.3.2. Parámetros analizados:

Para los ratones sacrificados el día 42, es decir sensibilizados sólo frente a PLV o PLC se midieron los siguientes parámetros siguiendo los mismos protocolos descritos en el apartado 5.1:

- Evaluación de los síntomas tras las dosis de choque.
- Niveles plasmáticos de IgG1 específica frente a PLV o PLC.
- Niveles plasmáticos de IL-4, como citoquina T_H2 y de IFN- γ como T_H1.

En el caso de ratones sensibilizados también frente a OVA, tras la dosis de choque intraperitoneal los ratones se sacrificaron y se midieron los siguientes parámetros:

- Evaluación de los síntomas.
- Niveles plasmáticos de IgG1 frente a OVA, que se determinaron siguiendo el mismo protocolo descrito para la IgG1 específica frente a proteínas de leche (ver 5.1.3), pero cubriendo la placa con una solución de OVA a 20 μ g/ml.

5.4. Hidrólisis de las proteínas lácteas por bacterias probióticas e influencia sobre su alergenicidad

5.4.1. Hidrólisis enzimática de la leche de vaca:

Con objeto de comparar la hidrólisis de las proteínas lácteas por los probióticos con un proceso de hidrólisis más parecido al utilizado en la elaboración de fórmulas hipoalergénicas, se sometió la leche de vaca a la acción de enzimas hidrolíticas.

Para ello, 500 ml de leche de vaca desnatada se hidrolizaron con un enzima comercial: Multifect P-3000 (*Genencor Internacional*). Se trata de una endopeptidasa alcalina aislada de una cepa de *Bacillus subtilis* modificada genéticamente. La hidrólisis se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

- 1% de enzima, es decir, 1g de enzima por cada 100g de proteína.
- pH= 8,5 controlado con NaOH 2N.
- Temperatura 50°C.
- 3 horas de incubación.

Una vez concluida la hidrólisis, se paró la reacción por calor (3 horas a 55°C). Del producto resultante se guardó una alícuota para el análisis de la distribución de pesos moleculares y el resto se congeló a -80°C hasta su utilización.

5.4.2. Hidrólisis de las proteínas lácteas por bacterias probióticas:

Se partió de 50 ml de leche de vaca desnatada a la que se adicionaron dos bacterias probióticas diferentes 10^8 cfu/ml de cada una de ellas:

- *Lactobacillus coryniformis* (CECT 5711): aislada de queso de cabra.
- *Lactobacillus gasseri* (CECT 5714): aislada de leche humana.

Una vez añadidas las bacterias a la leche, se procedió a la incubación durante 20 horas a 37°C y en condiciones de anaerobiosis. Concluida la incubación se tomó una alícuota de la leche fermentada para hacer un recuento de las bacterias presentes al final de la fermentación, otra para analizar la distribución de pesos moleculares de los péptidos resultantes y el resto se congeló a -80°C hasta su utilización.

Para comprobar si el efecto era debido a la hidrólisis de las proteínas o a la simple presencia de los probióticos en la leche, a 50 ml de leche de vaca desnatada se le adicionó la misma cantidad de las dos bacterias presente en la leche anterior al final de la fermentación, que resultó ser de $3,5 \cdot 10^8$ cfu/ml de cada bacteria. Inmediatamente después la leche se congeló a -80°C para evitar la acción de las bacterias sobre las proteínas.

5.4.3. Análisis de la distribución de los pesos moleculares de los péptidos resultantes:

El análisis de los pesos moleculares de los péptidos resultantes de la hidrólisis se llevó a cabo por cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) según un método previamente publicado (Boza JJ y col, 1995). Se utilizaron dos columnas en serie TSK-gel G2000-SW (*Tosohaas*) de 30 cm de longitud y 7,5 mm de diámetro interno. El eluyente fue guanidina clorhídrica 6M a 1ml/min. Los efluentes de la columna se detectaron mediante lecturas de absorbancia a 260nm. Se utilizaron como referencia los siguientes péptidos y proteínas: albúmina sérica (67000), albúmina de huevo (44000), quimotripsinógeno (25000),

ribonucleasa A (13700), insulina (6000), insulina A (2531), péptido inductor del sueño (849) y fenilalanina (165).

5.4.4. Animales y diseño experimental:

Una vez más se utilizó el mismo modelo animal de sensibilización frente a las proteínas de leche de vaca descrito en el apartado 5.1.1. En este caso los grupos de animales (n=8 por grupo) fueron los siguientes (figura 5-4):

- **Grupo CT:** grupo control-toxina colérica, que recibió 0,3 µg/g de ratón de toxina colérica disuelta en PBS.
- **Grupo V:** estos animales recibieron 1mg/g de PLV no tratadas.
- **Grupo VF:** estos animales se sensibilizaron con 1mg/g de PLV hidrolizadas por la mezcla de probióticos.
- **Grupo V+PRO:** este grupo recibió 1mg/g de PLV no tratadas pero adicionadas de la misma cantidad de probióticos de la mezcla anterior.
- **Grupo VH:** estos animales se sensibilizaron con 1mg/g de PLV hidrolizadas enzimáticamente

En los grupos V,VF,V+PRO y VH se utilizó toxina colérica como adyuvante a la concentración de 0,3 µg/g.

Las dos dosis de choque fueron a base de PLV (30 mg/ratón) separadas 30 minutos.

5.4.5. Parámetros analizados:

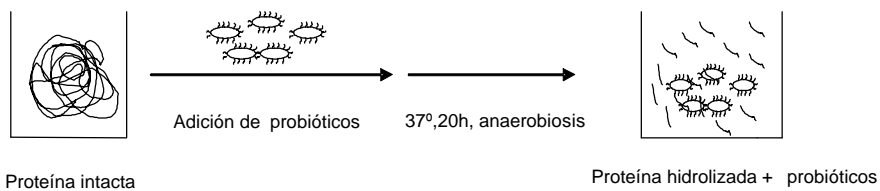
En este experimento se analizaron los siguientes parámetros según los protocolos descritos en el apartado 5.1.:

- Evaluación de los síntomas, mediante el sistema de puntuación ya descrito (ver 5.1.2).
- Niveles plasmáticos de IgG1 específica frente a PLV y de histamina (ver 5.1.3).
- Niveles plasmáticos de IgE y de IL-4. El método de ELISA utilizado no permitió detectar IgE específicas y por ello se muestran los resultados de la IgE total.

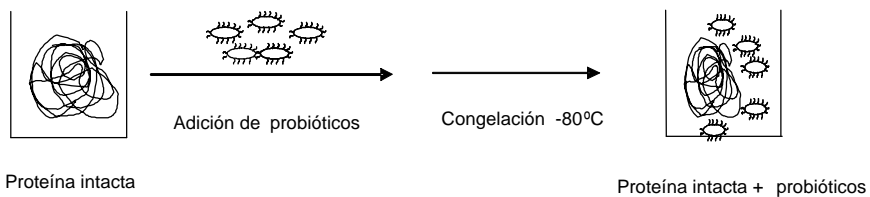
- Ensayo de proliferación de linfocitos procedentes de bazo, usando como estímulo PLV (100 $\mu\text{g/ml}$) (ver 5.1.4). En este caso el cultivo de linfocitos se contaminó por lo que no se presentan los resultados, aunque sí se pudo calcular el número de linfocitos que componían el bazo de los ratones de cada grupo.
- Recuento de bacterias de la flora fecal de los animales.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo de la misma forma descrita en el apartado anterior (ver 5.1.5).

Grupo VF



Grupo V+PRO



Grupo VH

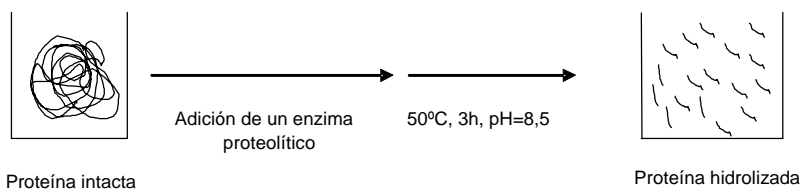


Figura 5-4. Hidrólisis enzimática y por probióticos de las PLV.

6. EFECTO DE LA LECHE DE CABRA SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.

6.1. Comparación del efecto de dietas a base de leche de vaca y de cabra sobre el sistema inmunitario de ratones

Debido a las diferencias en la composición de las leches de vaca y cabra, principalmente en lo que a proteínas, lípidos y carbohidratos se refiere, y dada la influencia que estos tres componentes de la dieta tienen sobre el sistema inmunitario, nos pareció interesante evaluar los efectos inmunológicos de dietas a base de leche de vaca y cabra.

Para ello se utilizaron ratones sanos que fueron alimentados con ambas dietas o con una dieta control, y se compararon diferentes parámetros inmunológicos.

6.1.1. Preparación de las dietas:

El objetivo era preparar unas dietas que cumplieran los requisitos establecidos por el Instituto Americano de Nutrición (IAN) para ratones (Reeves PG y col, 1995), pero con macro-componentes derivados de la leche de vaca o de cabra.

Para ello, se liofilizaron leches de vaca y de cabra para obtener leches en polvo. A continuación se analizó la composición de las leches en polvo y se comparó con las citadas recomendaciones del IAN (tabla 6-1).

	Recomendaciones IAN g/100g	leche vaca en polvo g/100g	leche cabra en polvo g/100g
Proteínas	20	28,6	27,3
Lípidos	5	4,8	6,4
Carbohidratos	68	41,9	42,7

Tabla 6-1. Comparación de los componentes mayoritarios de las dietas de vaca y cabra en polvo y las recomendaciones del IAN.

Para corregir las diferencias entre la composición de las leches en polvo y las recomendaciones se utilizaron los siguientes componentes:

- Hidratos de carbono: almidón de maíz.
- Grasa: mantequilla de leche de vaca y grasa de leche de cabra obtenida a partir de un queso fresco de cabra.

Finalmente la composición de las dietas en comparación con una dieta estándar de ratones quedó como se muestra en la tabla 6-2. La composición tanto de macro- como de micro-componentes fue muy similar a la dieta estándar, lo que aseguraba un crecimiento y desarrollo normal de los animales.

Componentes	g/100 g de dieta		
	estándar	vaca	cabra
Proteína	20	18,7	18,6
Caseína (Arla foods)	20		
Proteína de leche		18,7	18,6
Grasa	5	4,8	4,7
Aceite de girasol (Koipe)	5	0	0
Grasa de leche	0	4,8	4,7
Carbohidratos	68	66,4	67
Almidón	68	34,4	30,6
azúcares de leche	0	32	36,4
Fibra	5	5	5
Celulosa	5	5	5
L-metionina	0,3	0,3	0,3
Mezcla vitaminas-minerales	1	1	1

Tabla 6-2. Composición final de las dietas utilizadas para comparar los efectos de la leche de vaca y cabra sobre el sistema inmunitario.

6.1.2. Diseño experimental:

Se utilizaron ratones Balb/C de 4 semanas de edad, que se mantuvieron durante todo el experimento en condiciones controladas de luz y temperatura (20°C y ciclos de 12h de luz-oscuridad). Los ratones se dividieron en 3 grupos (n=8) y se alimentaron con diferentes dietas:

- **Grupo control (C):** dieta estándar para ratones, proporcionada por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.
- **Grupo vaca (V):** dieta en polvo a base de leche de vaca.

- **Grupo cabra (CB):** dieta en polvo a base de leche de cabra.

Los animales fueron alimentados con estas dietas durante 30 días, tomando muestras semanales de heces y controlando el peso también una vez por semana.

Transcurridos los 40 días los animales fueron sacrificados por anestesia profunda mediante inyección intraperitoneal de pentotal sódico (50 mg/ kg de peso corporal). Se tomaron muestras de sangre en tubos tratados con EDTA y se extrajo el bazo para pesarlo y cultivar los linfocitos aislados de este órgano.

6.1.3. Determinación de parámetros plasmáticos:

La sangre se centrifugó (3500 rpm, 4°C, 10 min) y se hicieron alícuotas de plasma que se congelaron a -80°C hasta su utilización para la determinación de diferentes inmunoglobulinas y citoquinas. Estas determinaciones se llevaron a cabo por métodos de ELISA comerciales (*Bethyl laboratories* y *Biosource*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.1.4. Cultivo de linfocitos aislados del bazo:

El cultivo de los linfocitos derivados del bazo se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito (ver apartado 5.1.4). Estos linfocitos se utilizaron para llevar a cabo ensayos de proliferación y producción de citoquinas.

Ensayo de proliferación

Se llevó a cabo por el mismo protocolo descrito anteriormente (ver apartado 5.1.4). La única diferencia es que en este caso, como los ratones no estaban sensibilizados frente a las proteínas de la leche, se utilizaron otros estímulos de la proliferación: ConA (5µg/ml), mitógeno específico de linfocitos T, y LPS (50µg/ml), estímulo específico de linfocitos B.

Análisis del perfil de citoquinas producido por los linfocitos

Para este ensayo se utilizó el protocolo descrito en el apartado anterior (ver apartado 5.1.4) pero utilizando como estímulos únicamente la ConA y el LPS. Se determinaron los niveles de diferentes citoquinas e inmunoglobulinas producidos por los linfocitos mediante métodos comerciales de ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (*Bethyl laboratories* y *Biosource*). Los métodos de ELISA utilizados no permitieron detectar la concentración de inmunoglobulinas en el sobrenadante del cultivo de linfocitos.

6.1.5. Efecto de las diferentes dietas sobre los lactobacilos y bífidobacterias de la flora fecal:

Las heces de los ratones se homogenizaron en agua de peptona (*AES laboratories*) a una concentración de 100 mg/ml. A continuación se hicieron diluciones 1/10 seriadas hasta 1/10⁸. Estas diluciones se cultivaron en medio de Man, Ragosa, Sharpe (MRS) para hacer recuentos de lactobacilos y en MRS suplementado con 0.5 mg/L de dicloxaciclina, 1 g/L de LiCl y 0.5 g/L de L-Cisteína, para recuentos de bífidobacterias. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 20h en anaerobiosis (lactobacilos y bífidobacterias) Cada muestra se procesó por triplicado y los resultados se expresaron como log cfu/ml.

6.1.6. Análisis estadístico:

La significación estadística ($P < 0,05$) se calculó mediante el método del análisis de varianzas (ANOVA) de una vía y los *test a posteriori* adecuados a cada parámetro. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS (versión 12.0). Los análisis de las diferentes muestras realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm error estándar medio (EEM).

7. EFECTOS FUNCIONALES DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE LA LECHE DE CABRA:

7.1. Aislamiento de oligosacáridos de leche de cabra

Se utilizó un procedimiento de aislamiento anteriormente descrito (Martínez-Férez A, 2004) y que ha sido recogido en la solicitud de patente nº P200400053. De forma breve, se parte de leche de cabra que se desnata por centrifugación a 3000 g y 4°C durante 20 minutos. Una vez eliminada la capa lipídica, la fase acuosa se filtra con lana de vidrio, se adiciona etanol 66% a 4°C, y se mantiene en agitación y en hielo durante 2 horas, con objeto de precipitar las proteínas.

La fracción resultante de este proceso, que contiene carbohidratos y sales, se inyecta en una columna Sephadex G-25 (900x200 mm d.i.) conectada a un sistema de cromatografía líquida de media presión (FPLC) y se eluye con agua para reducir los niveles de lactosa y sales. Finalmente la fracción carbohidrato-positiva se liofilizó y se analizó por cromatografía en capa fina de alta resolución (HP-TLC) y cromatografía de intercambio aniónico a alto pH con detección amperométrica pulsante (HPAEC-PAD). Así se consiguieron identificar más de 20 estructuras de oligosacáridos diferentes. La fracción liofilizada es la que se utilizó para los ensayos de bioactividad *in vitro* e *in vivo* que se describen a continuación.

7.2. Ensayos de actividad *in vitro* y transporte a través del epitelio intestinal

7.2.1. Ensayo de inhibición de la adhesión de microorganismos patógenos:

El papel de los oligosacáridos como receptores de patógenos ha cobrado un gran interés en los últimos años. Estos azúcares tienen una estructura muy similar a la de los puntos de anclaje de bacterias en algunas células, entre ellas las del epitelio intestinal.

Para comprobar si los oligosacáridos eran capaces de bloquear los receptores de microorganismos patógenos se llevó a cabo un experimento

consistente en marcar bacterias patógenas con [³H]-timidina e incubar células intestinales con oligosacáridos y las bacterias marcadas. Tras un tiempo de incubación se cuantificó la cantidad de bacterias (contaje de [³H]-timidina).

Marcaje de bacterias patógenas con [³H]-timidina

Se utilizaron tres bacterias patógenas: *Escherichia coli*, *Salmonella cholerasuis thyphi* y *Listeria monocytogenes* subespecie Ohio. Partimos de un cultivo de cada una de estas bacterias en fase estacionaria, del que se adicionan 10µl a 1ml de medio Tryptic Soy Broth (TSB) al que previamente se ha añadido [³H]-timidina (*Amersham*) a una concentración final de 1µCi/ml. La mezcla anterior se incubó durante 12h a 37°C.

Los cultivos se centrifugaron (13000rpm, 5min), se lavaron 2 veces con PBS y finalmente se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se midió la radioactividad incorporada calculándose el valor de cpm/ml de cada suspensión bacteriana.

Ensayo de adhesión en presencia de oligosacáridos

Para este ensayo se utilizaron células HT-29, una línea celular estable derivada de adenocarcinoma de colon proporcionada por la Asociación Americana de Cultivos Tipo (ATCC). El medio de cultivo de estas células se compone de: DMEM alto en glucosa, 10% de suero fetal bovino, 0,3 mg/ml de glutamina y 1% de una mezcla comercial de aminoácidos no esenciales (PAA laboratories).

Las células HT-29 se cultivaron en placas de 24 pocillos hasta 21 días post-confluencia. Se añadieron los oligosacáridos de leche de cabra (2,5 mg/pocillo en PBS) y las bacterias (50µl de cada suspensión) y se incubaron las placas a 37°C y 5% de CO₂ durante 2h. El efecto de los oligosacáridos de leche de cabra se comparó con el de unos FOS comerciales (*Actilight*, *Beghin-meiji*) (2,5 mg/pocillo).

Transcurrido este tiempo se centrifugaron las placas (1500rpm, 5min) para eliminar el sobrenadante en el que estarían las bacterias no adheridas. A continuación los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y finalmente se adicionaron 200µl/pocillo de una solución de ácido tricloro-acético al 10% a 4°C. Transcurridos 20 minutos de incubación a 4°C, se volvieron a hacer 2 lavados con la misma

solución de ácido tricloro-acético. Finalmente las células se resuspendieron en 100µl de PBS y se añadieron a 2ml de líquido de centelleo (*ICN laboratories*) para medir la radioactividad adherida a las células.

Como control se utilizaron varios pocillos a los que no se añadieron oligosacáridos y los resultados se expresaron en porcentaje de adhesión:

$$(cpm\ iniciales - cpm\ finales) \times 100 / cpm\ iniciales$$

7.2.2. Ensayo de capacidad prebiótica:

En este caso el objetivo es comprobar si diferentes bacterias probióticas y patógenas son capaces de fermentar los oligosacáridos, y crecer en medios ricos en estos azúcares. Para ello se cultivan las bacterias en un medio con un indicador de pH que lleva los oligosacáridos como único azúcar, y tras un tiempo de incubación se analiza el cambio de pH, que se produce como consecuencia de la producción de ácidos durante la fermentación de estos compuestos.

Cultivo de bacterias probióticas y patógenas

Se utilizaron las siguientes bacterias:

- Probióticas:
 - Bifidobacterium animalis*
 - Lactobacillus fermentum*
 - Lactobacillus salivarius*
- Patógenas:
 - Salmonella cholerasuis typhi*
 - Escherichia coli*

Estas bacterias se crecieron en medio MRS para las probióticas y TSB para las patógenas y se cultivaron durante 18 horas a 37°C para la obtención de un cultivo en fase estacionaria. Los probióticos se crecieron en condiciones de anaerobiosis.

Ensayo de fermentación

Una vez obtenidos los cultivos y con objeto de que las cantidades de bacterias utilizadas fueran similares, se ajustó la densidad óptica (DO) a 600nm de cada cultivo hasta un valor de 0,6 unidades.

El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos y en cada pocillo se añadieron las siguientes cantidades:

- 160µl de medio de cultivo sin azúcares: MRS sin glucosa para los probióticos y medio Luria Bertani (LB) para las bacterias patógenas.
- 20µl del cultivo de bacterias.
- 10µl de una solución de los diferentes azúcares (oligosacáridos de leche de cabra, glucosa o FOS) a 50mg/ml, es decir una concentración final de 2,5mg/ml.
- 10µl de una solución de rojo-fenol al 3% en agua.

Las placas se incubaron 24h a 37°C, las patógenas en presencia de oxígeno y las probióticas en anaerobiosis. Durante esta incubación si las bacterias fermentaban el azúcar objeto de estudio, se produciría una bajada de pH y un cambio de color del indicador. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia en cada pocillo a 570nm.

El experimento se llevó a cabo por triplicado y se utilizaron como control pocillos en los que no se puso ningún azúcar (basal) y otros en los que se puso glucosa, que es fermentada por todos los microorganismos incluidos en el estudio. Los resultados se expresaron como DO azúcar/DO basal.

7.2.3. Transporte a través de un modelo *in vitro* de epitelio intestinal:

Descripción del modelo

Otro aspecto interesante era evaluar si los oligosacáridos de leche de cabra se absorbían a nivel intestinal. De esta forma, se podría pensar no sólo en efectos locales sino también en posibles efectos sistémicos.

Con este objetivo se utilizó un modelo *in vitro* de epitelio intestinal, consistente en una placa de 24 pocillos, en cada uno de los cuales hay una monocapa de células Caco-2 en cultivo polarizado de 14 días sobre filtros de

policarbonato de 0,4 μm de diámetro de poro (figura 7-1). El medio de cultivo utilizado para este tipo de células tiene la siguiente composición: DMEM alto en glucosa, 10% de suero fetal bovino, 0,3 mg/ml de glutamina y 1% de una mezcla de aminoácidos no esenciales (PAA laboratories). Estas placas fueron proporcionadas por *Advancell (Caco-Ready™)*.

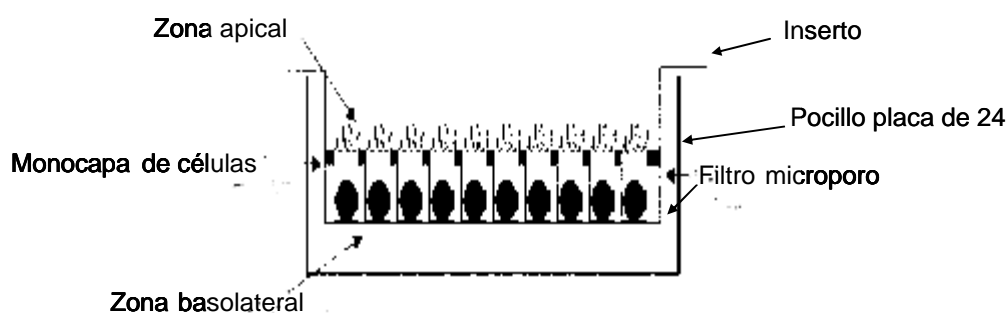


Figura 7-1. Esquema de un pocillo de la placa de células Caco-2 utilizada para el ensayo de transporte de oligosacáridos de leche de cabra.

En cada uno de los pocillos existen dos zonas:

- Zona apical, equivalente a la zona del lumen intestinal, donde se coloca la sustancia a analizar disuelta en 500ml del siguiente tampón de transporte a pH=7,4 (NaHCO_3 26mM, CaCl_2 1,8mM, MgCl_2 1,2mM, KCl 4,7mM, NaCl 127mM, Glutamina 1mM, HEPES 20nM).
- Zona basolateral, equivalente a la capa serosa, donde se recoge el producto final que ha atravesado la monocapa de células Caco-2 después de la incubación. En esta parte se pone 1ml del tampón de transporte.

Para comprobar la integridad de la monocapa de células se mide la resistencia eléctrica transepitelial (RET) entre las zonas apical y basolateral, que debe ser superior a 1000 ohmios/cm². Así mismo, tras el experimento se comprueba la integridad de la monocapa mediante la adición, en la zona apical de cada pocillo, de azul de tripán disuelto en el tampón de transporte (0,005%) que en condiciones normales no atraviesa la monocapa. Tras 1 hora de incubación se mide la absorbancia a 595nm en la zona basolateral, para comprobar si el colorante ha pasado la monocapa.

Ensayo de transporte

Este ensayo se realizó según el protocolo descrito en el apartado anterior. De forma breve, la fracción de oligosacáridos obtenida, se disolvió en el tampón de transporte hasta una concentración de 6 mg/ml. Como control se utilizó una solución de α -metil-amionoglucósido en el mismo tampón (100 μ g/ml) que está demostrado que atraviesa una monocapa de este tipo (Gnoth MJ y col, 2001). 500 μ l de cada una de las soluciones anteriores se añadieron a la zona apical, de manera que la cantidad final de cada compuesto fue:

- Oligosacáridos de leche de cabra: 3mg/pocillo.
- α -metil-amionoglucósido: 50 μ g/pocillo.

Tras 90 minutos de incubación a 37°C y en atmósfera con 5% de CO₂, se recogió todo el volumen de la zona basolateral, que se sometió a evaporación por vacío hasta sequedad, con objeto de concentrar el producto final tras el transporte, ya que los porcentajes de absorción esperados no eran muy altos. Finalmente el contenido de cada muestra se analizó por HPAEC-PAD.

7.3. Efecto de los oligosacáridos en modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD)

7.3.1. Efecto de los fructooligosacáridos (FOS) en un modelo de inflamación intestinal por ácido trinitro-benceno-sulfónico (TNBS):

Para evaluar el efecto de los FOS comerciales (*Beghin-meiji*) se utilizó un modelo experimental de colitis inducida por TNBS muy útil para el estudio de la inflamación de colon en animales (Morris GP y col, 1989). La administración de un enema de TNBS disuelto en etanol provoca una irritación a nivel de colon que conduce a una inflamación que generalmente responde a los mismos tratamientos que se aplican a la IBD humana.

El TNBS actúa como hapteno al unirse a proteínas y provocar una respuesta inmunológica que desencadena una inflamación intestinal, caracterizada por la aparición de granulomas, úlceras e infiltración de células mononucleares (Morris GP y col, 1989).

Diseño experimental

Se utilizaron ratas Wistar hembras de 180-200 g de peso que se colocaron en jaulas individuales y en condiciones controladas de luz y temperatura (ciclos de 12h de luz-oscuridad).

Los animales fueron divididos en 3 grupos que fueron alimentados con la misma dieta base pero diferente fuente de fibra (tabla 7-1):

- **Grupos Control TNBS** (n=10) y **Control sano** (n=20): celulosa al 5% del total de la dieta.
- **Grupo FOS** (n=20): FOS al 5% del total de la dieta.

Tras 15 días de alimentación con las dietas anteriormente citadas y antes de la inducción de la enfermedad, 10 animales control y 10 del grupo FOS fueron sacrificados para comprobar la capacidad prebiótica de los FOS en ratas sanas (figura 7-2). Tras el sacrificio se extrajo el contenido del colon que se utilizó para la determinación del pH y del contenido de bacterias probióticas (lactobacilos y bifidobacterias) según el protocolo que se describe más adelante. Además se cuantificó la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)-acético, propiónico y butírico-en el contenido colónico.

Por otra parte, a las ratas de los grupos control-TNBS y FOS (n=10 de cada grupo) se les indujo una colitis por administración intrarrectal de una solución de 10mg TNBS/rata en 250µl de etanol al 50% (V/V). Durante 7 días más las ratas fueron alimentadas con las mismas dietas y finalmente el día 21 se sacrificaron y de cada animal se extrajo: sangre, el colon y su contenido.

Inmediatamente tras su extracción se midieron el peso y la longitud del colon. A continuación se introdujo en PBS a 4°C y se dividió en diferentes partes:

- Una primera parte se abrió longitudinalmente, se conservó en una solución de formaldehído a 4°C y se embebió en parafina para realizar cortes histológicos.
- El resto se congeló a -80°C para determinaciones bioquímicas: glutatión total y actividad MPO.

El contenido del colon también se dividió en tres partes, una se utilizó para la cuantificación de AGCC, otra para el análisis de la flora bacteriana fecal, y el resto se homogenizó en agua destilada y se empleó para la determinación del pH.

	Control (g/kg)	FOS (g/kg)
Proteínas y aminoácidos		
Caseína (Arla foods)	258	258
L-metionina (Sigma)	3	3
Lípidos		
Aceite de girasol (Koipe)	50	50
Vitaminas/Minerales		
Mezcla vitaminas/minerales (Panlab)	10	10
Carbohidratos		
Almidón de maíz (Cerestar)	579	579
Sacarosa (Azucarera Ebro)	50	50
Celulosa (Sigma)	50	0
FOS (Beghin-meiji)	0	50

Tabla 7-1. Composición de las dietas para el estudio de evaluación de los FOS en un modelo animal de IBD por TNBS.

Evaluación del estado de los animales

El peso de los animales y el consumo de dieta fueron evaluados semanalmente durante los primeros 15 días y a diario los últimos 7 días. La presencia de sangre en las heces y de diarrea también fue evaluada a diario a partir del día 14.

Inmediatamente tras el sacrificio se evaluó el daño a nivel de colon según criterios anteriormente publicados (Camuesco D y col, 2005).

Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

El contenido de colon distal se homogenizó en proporción 1:5 (p/v) en una solución de NaHCO₃ 150mM a pH 7,8, en atmósfera de argón. A continuación las muestras se incubaron a 37°C durante 24h. Transcurrido este tiempo se procedió a la extracción y cuantificación de los AGCC. Para ello a 1ml del homogenado fecal se le añadieron 50µl de una solución 100mM de ácido-2-metil-valérico, que se utilizó como patrón interno, y una gota de H₂SO₄ concentrado.

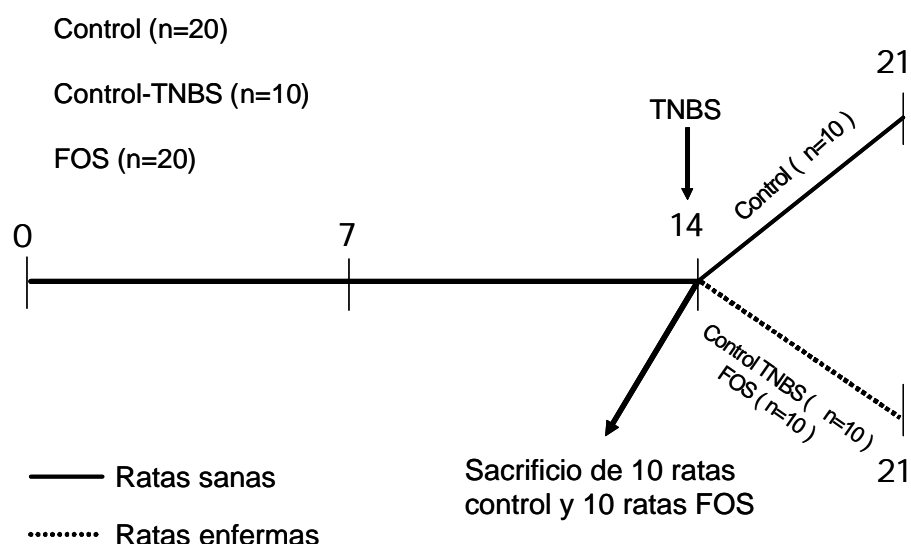


Figura 7-2. Esquema del diseño experimental del estudio de evaluación de FOS en un modelo animal de IBD por administración de TNBS.

A continuación se adicionaron 300µl de acetato de etilo, se agitó suavemente y se centrifugaron las muestras (14000rpm, 5min, 4°C). Así se separan dos fases, una inferior acuosa y otra superior orgánica en la que se encuentran los AGCC. Esta última fase se deshidrata por adición de una punta de espátula de Na₂SO₄ anhidro y se analiza por cromatografía de gases con detección por ionización de llama (GC-FID). Los resultados se expresaron como mg de AGCC/g de contenido de colon.

Cuantificación de la flora bacteriana fecal

El contenido del colon se homogenizó en agua de peptona a una concentración de 100mg/ml. A continuación se hicieron diluciones 1/10 seriadas hasta 1/10⁸. Estas diluciones se cultivaron en medios específicos para hacer recuentos de lactobacilos (MRS), bifidobacterias (MRS suplementado con 0.5 mg/L de dicloxacilina, 1 g/L de LiCl and 0.5 g/L de L-Cisteína), coliformes, aerobios y enterobacterias (*Petrifilms*TM, 3M laboratories). Los cultivos se incubaron a 37°C durante 12h en aerobiosis (coliformes, aerobios y enterobacterias) o anaerobiosis (lactobacilos y bifidobacterias). Los resultados se expresaron en log cfu/mg de heces.

Determinación del contenido de glutatión total en colon

Para la determinación del contenido tisular de glutatión total se utilizó el método descrito por Anderson ME (1985). Este método se basa en la oxidación total del glutatión de la muestra, de manera que se genera la forma oxidada (GSSG). Esta oxidación provoca a su vez la reducción del ácido ditiónitrobenzoico (DTNB), lo cual supone un aumento de la absorbancia de este compuesto.

Las muestras de colon fueron homogenizadas en TCA al 5% en proporción 1:20 (p/v) y los homogenados se centrifugaron (10000rpm, 5min, 4°C). Los sobrenadantes obtenidos se incubaron en placas de 96 pocillos junto con los siguientes reactivos:

- 20µl del sobrenadante obtenido tras la homogenización del tejido.
- 5 µl de una solución de EDTA en PBS a 6,3mM.
- 140 µl de NADPH a 0,289mM.

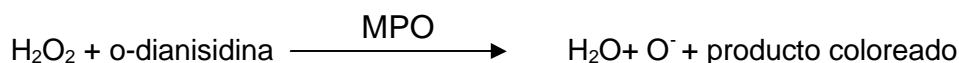
Tras incubar 5 minutos a 30°C se añadieron 15µl de glutatión reductasa (*Boehringer Ingelheim*) en PBS-EDTA a 4UI/ml. Finalmente se midió el incremento de absorbancia a 412nm.

La cantidad de glutatión total presente en las muestras se calculó en función de la pendiente de la curva obtenida, por interpolación en una curva patrón realizada con glutatión oxidado. Cada análisis se llevó a cabo por triplicado y los resultados se expresaron en nmol/g de tejido.

Determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO)

La mieloperoxidasa (MPO) es un enzima presente mayoritariamente en los neutrófilos. Su actividad refleja el grado de inflamación de los tejidos analizados, ya que es un indicador de la infiltración intestinal de neutrófilos a causa de dicha inflamación.

La actividad MPO se midió de acuerdo con el método descrito por Krawisz y col. (1984) Este método se basa en la reacción de reducción del agua oxigenada por la MPO en presencia de o-dianisidina:



Entre 100 y 200 mg de la muestra de colon pulverizada en nitrógeno líquido, se homogenizaron por sonicación en 1ml de una solución de bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (HTAB) al 0,05% en tampón fosfato sódico 20mM a pH=6. A continuación las muestras se centrifugaron (10000 rpm, 4°C, 15 min) y se recogió el sobrenadante, donde se encontraba el enzima. Una alícuota de este sobrenadante se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas mediante un método comercial (*BCA Protein Assay Reagent, Pierce*).

A continuación 50µl del sobrenadante se incubaron con 150µl del tampón de reacción (o-dianisidina 167µg/ml, H₂O₂ 0,005%, tampón fosfato sódico 50mM a pH=6). Finalmente se midió la absorbancia a 450nm durante 2 minutos.

La actividad MPO se calculó por interpolación en una curva patrón realizada con MPO procedente de neutrófilos humanos. Los resultados se expresan como U/mg de proteína, sabiendo que 1U de actividad MPO es la cantidad de enzima que degrada 1mmol/min de peróxido de hidrógeno.

Análisis histológico de las muestras de colon

Secciones colónicas de 5µm de espesor se tiñeron con hematoxilina y eosina y fueron evaluadas por dos patólogos por separado que no conocían los grupos del experimento. En función de las lesiones cada muestra fue puntuada según un criterio previamente publicado (Stucchi AF y col, 2000) que valora el daño que se observa a nivel del epitelio, las criptas, la lámina propia y la submucosa (tabla 7-2):

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como media ± error estándar medio (EEM). En todos los casos las diferencias significativas (P<0,05) fueron calculadas mediante el análisis de las varianzas de una vía (ANOVA) y los *test a posteriori* adecuados para cada parámetro analizado: test de Fisher para valores paramétricos y test de Mann-Whitney para los no paramétricos.

Ulceración del epitelio	Lámina propia	Submucosa
0: ninguna	Infiltrado mononuclear	Infiltrado mononuclear
1: leve	0: ninguno	0: ninguno
2: moderada	1: leve	1: leve
3: severa	2: moderado	2: moderado
	3: severo	3: severo
Criptas		
Actividad mitótica	Infiltrado de granulocitos	Infiltrado de granulocitos
0: baja	0: ninguno	0: ninguno
1: media	1: leve	1: leve
2: moderada	2: moderado	2: moderado
3: alta	3: severo	3: severo
Pérdida del moco	Vascularidad	Edema
0: ninguna	0: ninguno	0: ninguno
1: leve	1: leve	1: leve
2: moderada	2: moderado	2: moderado
3: severa	3: severo	3: severo

Tabla 7-2. Sistema de puntuación del daño microscópico a nivel del colon. La puntuación máxima para un animal es de 27 puntos. (Stucchi AF y col, 2000).

7.3.2. Efecto de una dieta rica en oligosacáridos de leche de cabra en ratas con colitis inducida por sulfato de dextrano (DSS):

Una vez analizada la influencia de los oligosacáridos comerciales en la inflamación intestinal, decidimos estudiar el efecto de los oligosacáridos obtenidos a partir de la leche de cabra (ver apartado 7.1) en un modelo de IBD más adecuado para el estudio de la influencia de la dieta en esta patología.

Este experimento lo llevamos a cabo en el departamento de Nutrición y Metabolismo Proteico del Instituto Nacional de Investigación Agrónoma (INRA) de Clermont-Ferrand (Francia). Se estableció una colaboración con el grupo que dirige la Dra. Obled, por su gran experiencia en el estudio de la influencia de la dieta en la colitis inducida por DSS.

La administración de DSS en el agua de bebida, provoca una lesión intestinal a nivel de las capas mucosa y submucosa que cursa con ulceración (Elson CO y col, 1995). Esta lesión desencadena una respuesta inflamatoria con participación activa del sistema inmunitario no específico (macrófagos, neutrófilos y mastocitos). Sin embargo ni la predisposición genética ni la respuesta inmunitaria específica parecen tener un papel relevante en este modelo. Por esta razón la colitis causada por DSS es un modelo de elección para el estudio de la influencia de factores ambientales, entre ellos la dieta, sobre la IBD.

En este caso pretendíamos evaluar los efectos preventivos y sobre todo curativos de los oligosacáridos de leche de cabra en esta patología. Por ello se utilizó un modelo animal consistente en una inflamación aguda seguida de un periodo de recuperación en el que no se administró DSS, para ver la influencia de los oligosacáridos en la recuperación del daño intestinal.

Diseño experimental

Se utilizaron ratas *Sprague-Dawley* machos (*Iffa Credo*) proporcionadas por la Unidad de Experimentación Animal del INRA de Clermont-Ferrand, que fueron individualizadas en una habitación con temperatura y luz controladas (22°C, con un ciclo de 12h de luz y 12 h de oscuridad) y libre acceso a comida y bebida. Después de una semana de aclimatación, los animales fueron divididos en dos grupos que fueron alimentados con la misma dieta base pero diferente fuente de fibra (tabla 7-3). Los animales se dividieron en los siguientes grupos (n=10):

- **Grupo control (C):** recibió una dieta con un 5% de celulosa.
- **Grupo oligosacáridos (OS):** fue alimentado con una dieta que contenía una mezcla de oligosacáridos de leche de cabra (2%) y celulosa (3%).

Tras 7 días de habituación a la dieta en polvo, el agua de bebida de las ratas fue sustituida por una solución de DSS (*ICN laboratories*) al 5% durante 4 días. Transcurrido este tiempo, se disminuyó la dosis de DSS hasta el 1% durante los siguientes 4 días. Finalmente se suprimió de nuevo el tratamiento con DSS durante 4 días de recuperación (figura 7-3). A partir del comienzo del tratamiento con DSS y hasta el final del experimento, el peso de las ratas y el consumo de dieta fueron controlados a diario.

De forma paralela, otros dos grupos de ratas *pair fed* (PF-C, n=10 y PF-OS n=8) fueron alimentados con las dietas C y OS respectivamente, en la misma cantidad ingerida por los animales de ambos grupos. A estas ratas no se les administró DSS, ya que se utilizaron para evaluar los efectos debidos a la disminución del consumo de dieta (anorexia) causada por el tratamiento con DSS.

	Control	OS
	g/kg de dieta	g/kg de dieta
Proteínas y aminoácidos		
Caseína (Arla foods)	258	258
L-metionina (Sigma)	3	3
Lípidos		
Aceite de girasol (Koipe)	50	50
Vitaminas/Minerales		
Mezcla vitaminas/minerales (Panlab)	10	10
Carbohidratos		
Almidón de maíz (Cerestar)	579	579
Sacarosa (Azucarera Ebro)	50	50
Celulosa (Sigma)	50	30
Oligosacáridos de leche de cabra	0	20

Tabla 7-3. Composición de las dietas para el estudio de evaluación de los oligosacáridos de leche de cabra en un modelo animal de IBD por DSS.

Sacrificio de los animales

Tras 8 días de tratamiento con DSS, los animales fueron sacrificados por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50mg/kg).

Se extrajo la sangre de cada animal por punción en la aorta abdominal, se recogió en tubos tratados con EDTA y se centrifugó (3500rpm, 10min, 4°C) para la obtención de plasma.

Además se extrajeron íleon, hígado, bazo y el músculo *gastrocnemius* que fueron pesados y congelados a -80°C hasta su utilización. Así mismo, se extrajeron el timo y el músculo *soleus* que fueron pesados únicamente.

La lesión provocada por la administración de DSS se manifiesta principalmente a nivel del colon. Por esta razón este tejido fue el que se estudió en mayor profundidad.

- Se tomó una muestra del contenido del colon con objeto de estudiar las poblaciones bacterianas y la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).
- 0,5 cm del colon se conservaron en solución de Bouin durante 48h con objeto de utilizarlas para el análisis histológico.
- 6 cm fueron utilizados para la extracción de la mucosa intestinal que se congeló a -80°C hasta su utilización con el objetivo de analizar los cambios en la expresión génica inducidos por el tratamiento con DSS.
- El resto del tejido fue utilizado para la determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) y la concentración de glutatión.

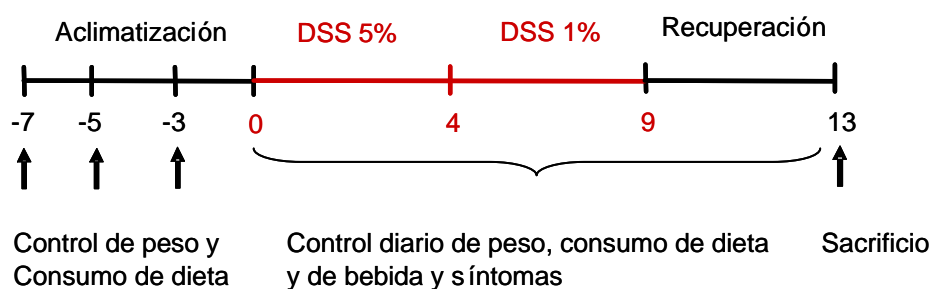


Figura 7-3. Esquema del modelo animal de IBD por DSS utilizado para estudiar el efecto de los oligosacáridos de leche de cabra.

Evaluación del estado de los animales

Desde el comienzo del tratamiento con DSS la presencia de diarrea y sangre en las heces fue evaluada por dos investigadores que no conocían los grupos experimentales, siguiendo un sistema de puntuación:

- | |
|--|
| <p>0: sin síntomas
 0,5: diarrea sin sangre
 1: diarrea con poca sangre
 1,5: diarrea severa sin sangre
 2: diarrea severa con poca sangre
 2,5: diarrea severa con abundante sangre</p> |
|--|

Determinación de la concentración tisular de glutatión en sus formas oxidada y reducida:

La determinación de la concentración tisular de GSH a nivel de colon se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución usando detección fluorimétrica (HPLC-FID) (Martin J y col, 1991). Este método permite separar la forma oxidada del glutatión (GSSG) de la forma reducida (GSH) con un único tratamiento de la muestra.

En primer lugar es necesario liberar el glutatión del interior de la célula evitando su oxidación. Para ello, una alícuota de 100mg de tejido pulverizado en

nitrógeno líquido se homogenizaron por sonicación en 2ml de PCA 5% y 50 µl de una solución quelante de hierro, compuesta por deferoxamina (180µM) y o-fenantrolina (180µM) disueltas en tampón HEPES 50mM. Tras centrifugar las muestras (13000g, 20min, 4°C), el sobrenadante se diluyó en función de la concentración esperada para cada tejido.

Una vez extraído el glutatión se procede a una primera derivatización con ácido yodoacético (IAA). A 400µl del sobrenadante diluido se le adicionan 20µl de la solución madre del estándar interno (ácido γ -glutamyl-glutámico 0,5 mM) y 50 µl de una solución de IAA (100mM) adicionada de rojo de m-cresol (0,2 mM) como indicador de pH. Así, el grupo tío (SH-) de la molécula de glutatión forma el derivado S-carboximetil que es estable a la oxidación. A continuación se ajusta el pH de cada muestra entre 8,2 y 8,5 mediante una solución de LiOH 1M. Este es un paso crítico en el protocolo, puesto que una alcalinización excesiva (pH>10) podría provocar la oxidación del glutatión. Una vez ajustado el pH, las muestras se mantienen a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 30 min.

El siguiente paso consiste en dotar a la molécula de un grupo fluorescente para que pueda ser detectada por fluorimetría. Para ello se adicionan 500µl de una solución de cloruro de dansilo (2mg/ml) y las muestras se mantienen durante 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

Transcurrido este tiempo, se adicionan 2ml de cloroformo con objeto de eliminar los restos de cloruro de dansilo que no hayan reaccionado. Finalmente la fase acuosa, que contiene los compuestos a analizar, se pasa a viales de cromatografía y se analiza por HPLC-FID (Mercier S y col, 2002). Los resultados se expresaron en nmol/g de tejido.

Determinación de la actividad mieloperoxidasa en muestras de colon:

Se llevó a cabo según el protocolo descrito en el apartado 7.3.1.

Análisis histológico

Secciones colónicas de 5µm de espesor se tiñeron con hematoxilina y eosina y fueron analizadas por dos investigadores por separado, que no conocían los grupos del experimento. En este caso, además de puntuar las muestras según

el criterio ya citado (apartado 7.3.1) se tomaron microfotografías con un microscopio Leika DM 5000B.

Estudio de la expresión génica mediante la utilización de microarrays (Chip U34) del genoma de rata

Con objeto de estudiar los cambios inducidos en la expresión génica por el tratamiento con DSS y si los oligosacáridos eran capaces de revertir estos cambios, se analizó la expresión de genes a nivel del colon, mediante la utilización de microchips. Este sistema consta de unos chips en los que se encuentran unos 8000 genes de la rata. A partir del ARN de las muestras de colon, se sintetiza ARNc que se hibrida con el chip, de manera que los genes de la muestra hibridan con los del chip dando lugar a señales fluorescentes cuya intensidad determina el nivel de expresión del gen (figura 7-4).

a) Preparación del ARNc:

Las muestras de colon de ratas control-DSS, OS-DSS y control-PF se utilizaron para extracción de ARN por el método del Trizol, siguiendo las instrucciones del fabricante (*Invitrogen*). Las muestras de ARN se hibridaron con el chip U34 de Affymetrix, que contiene 8000 genes de la rata.

Una vez extraído el ARN se convirtió en ARNc biotinilado. Para ello se utilizó un método comercial (*SuperScript Choice System, Invitrogen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un oligo-dT con un sitio de unión para una T7-ARN polimerasa. Una vez sintetizado el ARNc, el marcaje con biotina se realizó mediante otro método comercial (*MEGAscript In vitro Transcription kit, Ambion*), utilizando CTP y UTP biotinilados, junto con dNTPs no marcados. Los nucleótidos no incorporados se eliminaron con columnas *RNeasy (Quiagen)*.

b) Hibridación y visualización:

10 μ g de cada ARNc se fragmentaron a 94°C durante 35 minutos en un tampón de la siguiente composición: Tris-acetato pH 8,1 40mM, KOAc 100mM, MgOAc 30mM. Antes de la hibridación el ARNc fragmentado se calentó a 95°C durante 5 minutos en un tampón de hibridación 6X SSPE-T (6X: NaCl 1M, Tris pH

7,6 10mM, Triton 0,005%). A continuación el ARNc se enfrió a 40°C y finalmente se hibridó con el chip de *Affymetrix* durante 16h a 40°C y en rotación constante a 60rpm.

Una vez finalizada la hibridación el chip se lavó 10 veces con el tampón SSPE-T. El ARNc hibridado en el chip se tiñó con un conjugado estreptavidina-ficoeritrina a 10mg/ml (*Molecular Probes*) en tampón SSPE-T durante 30 minutos a 25°C. Finalmente, los chips se leyeron a 560nm usando un escáner (*Agilent Gene Array Scanner, Affymetrix*). Las lecturas se analizaron con un programa informático (*Affymetrix Gene Expresión Analysis Software*).

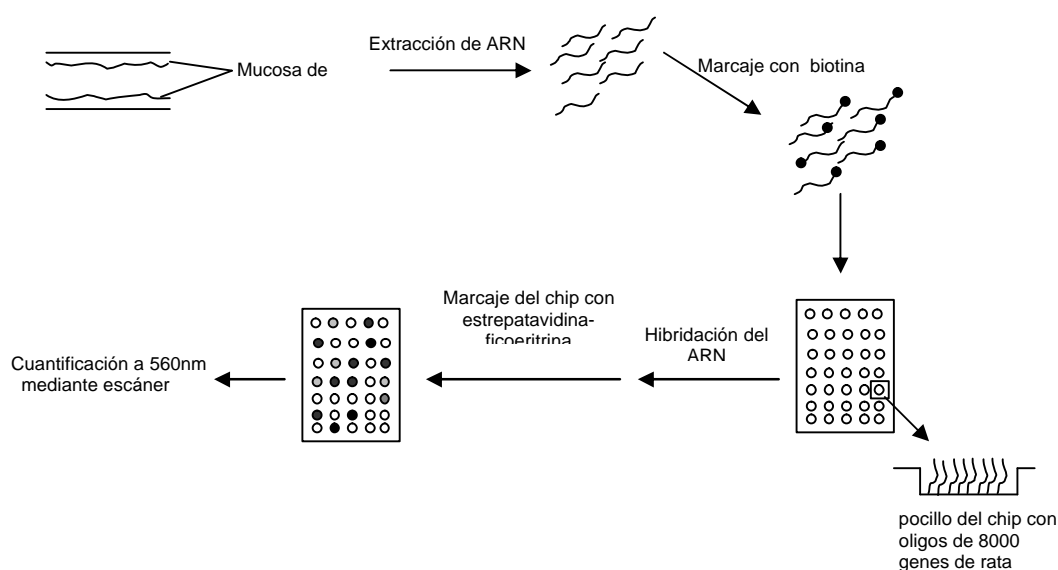


Figura 7-4. Análisis de la expresión génica mediante el empleo del chip U34 del genoma de rata.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar medio (EEM). El cálculo de las diferencias significativas ($P < 0,05$) se realizó de la misma forma descrita en el apartado 7.3.1, excepto para los resultados de expresión génica que se analizaron mediante el programa informático suministrado por la casa comercial (*Affymetrix Gene Expresión Analysis Software*).

8. PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA LECHE DE CABRA.

8.1 Obtención de péptidos a partir de las caseínas de la leche de cabra

El método utilizado para la obtención de péptidos a partir de proteínas de leche de cabra, está ampliamente descrito en la solicitud de patente nº EP04075587. De forma breve, se partió de leche de cabra desnatada, que se acidificó hasta pH=3 con objeto de precipitar las proteínas del lactosuero, que después fueron separadas por centrifugación. Las caseínas así obtenidas se concentraron por evaporación hasta una concentración de 10g de proteína por litro. A continuación, la caseína se hidrolizó mediante un enzima comercial (MULTIFECT P-3000, *Genencor*) al 1% (1 g de enzima/100g de proteína) durante 3 horas a 55°C. Finalmente la reacción se paró mediante calor (10 minutos a 100°C) y la mezcla obtenida fue secada por liofilización.

De esta forma se obtuvo un hidrolizado de las caseínas de la leche de cabra, compuesto por una mezcla de péptidos de un tamaño variable. Este hidrolizado se sometió a un ensayo de transporte a través de una monocapa de células Caco-2, según el protocolo descrito más adelante (ver apartado 8.2), con el objetivo de seleccionar sólo aquellos péptidos que atravesaran la monocapa, y que por tanto, podrían absorberse a nivel intestinal.

La fracción recogida en la zona basolateral de los pocillos de la placa de células Caco-2, fue purificada por cromatografía líquida de alta resolución con detección por espectrometría de masas (HPLC-MS). Los péptidos resultantes fueron identificados por microsecuenciación por la empresa *Eurosequence* (Matsudaira P, 1993).

Una vez secuenciados estos péptidos fueron sintetizados (*Eurosequence*) y se utilizaron para llevar a cabo los ensayos que se describen a continuación.

8.2. Ensayo de transporte a través del epitelio intestinal

En primer lugar, el hidrolizado obtenido por el sistema anteriormente descrito, se sometió a un ensayo de transporte utilizando el mismo modelo de epitelio intestinal descrito en el apartado 7.2.1. En la parte apical de varios

pocillos se añadió el hidrolizado obtenido disuelto en el tampón de transporte a una concentración de 1 g/ml. Como control se utilizó una solución de α -metilamionoglucósido en el mismo tampón (100 μ g/ml) que está demostrado que atraviesa una monocapa de este tipo (Gnoth MJ y col, 2001). Tras 90 minutos de incubación a 37°C y 5% de CO₂ se recogió el volumen de la zona basolateral, que se concentró por evaporación a vacío y se purificó por HPLC-MS.

Por el procedimiento anterior se llegó a la obtención de 3 péptidos que probablemente estarían presentes en el hidrolizado inicial y que atravesaban la monocapa de células Caco-2. Para comprobar si realmente los 3 péptidos aislados eran capaces de atravesar el epitelio intestinal, cada uno por separado se sometió a un nuevo ensayo de transporte. 100 μ g de cada uno de ellos se disolvieron en 500 μ l del tampón de transporte y se pusieron en la zona apical de 3 pocillos (un péptido por cada pocillo). Como control positivo se utilizó la misma solución del ensayo anterior. Tras una incubación de 90 minutos a 37°C y en atmósfera con 5% de CO₂, se recogió todo el volumen tanto de la zona apical como de la zona basolateral y se procedió a la identificación por HPLC-MS.

8.3. Ensayo de actividad antimicrobiana

Varios estudios muestran que algunos péptidos obtenidos a partir de la leche de vaca tienen actividad antimicrobiana y antiviral (van Hooijdonk AC y col, 2000; Liepke C y col, 2001). Con objeto de comprobar este mismo efecto por parte de los péptidos obtenidos a partir de las caseínas de leche de cabra se llevó a cabo un ensayo *in vitro* similar al que se utiliza para comprobar la sensibilidad de bacterias frente a antibióticos (antibiograma). Este ensayo se basa en la inhibición del crecimiento que provocan las sustancias con actividad antimicrobiana. Cuando estas sustancias difunden en un medio sólido se genera un gradiente de concentración que provoca un halo de inhibición circular, cuyo diámetro indica la potencia antimicrobiana de la sustancia ensayada (figura 8-1).

Para este ensayo se utilizaron 3 cepas de microorganismos patógenos: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* 89 y *Streptococcus mutans*. En primer lugar se prepararon cultivos de estas 3 bacterias en medio *Tryptic Soy Broth* (TSB) (*Biolife*). Una vez que estos cultivos se encontraban en la fase estacionaria (12 horas de incubación a 37°C), se añadieron al medio *Tryptic Soy Agar* (TSA) (*Biolife*) a 40-50°C en proporción 1% (v/v) y el medio con las bacterias se repartió

en placas de Peyer que se dejaron solidificar. Sobre las placas ya sólidas se hicieron unos orificios de 5mm de diámetro en los que se depositaron 50 μ l de las siguientes soluciones:

- Ciprofloxacino en suero salino a 0,02 mg/ml.
- Cada uno de los péptidos (P1, P2 y P3) en suero salino en un rango de concentraciones que fue desde 3 mg/ml hasta 300 mg/ml, es decir, desde 0,15 hasta 15 μ g de cada péptido por pocillo.

A continuación se incubaron las placas a 37°C durante 12 h para que los péptidos y el antibiótico difundieran a través del medio de cultivo. Tras este tiempo se midieron los diámetros de los halos de inhibición provocados por los diferentes péptidos y se compararon con el provocado por el ciprofloxacino.

8.4. Ensayos de inmunomodulación

Una de las características más ampliamente descritas de los péptidos derivados de la leche de vaca y humana es su capacidad inmuno-reguladora (Clare AD, 2000). Para comprobar si los péptidos obtenidos a partir de la leche de cabra tenían propiedades similares se desarrollaron algunos ensayos *in vitro*, que se describen a continuación.

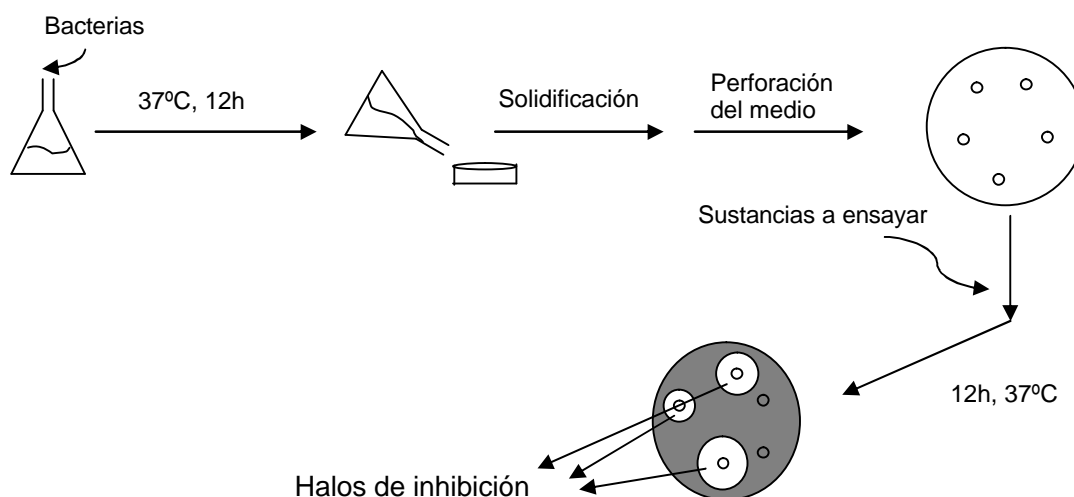


Figura 8-1. Esquema del ensayo de actividad antimicrobiana.

8.4.1. Ensayos de actividad sobre macrófagos:

Cultivo in vitro de macrófagos de ratón

Se obtuvieron macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de ratones Balb/C de 8 semanas de edad. Para ello los ratones fueron sacrificados por anestesia profunda mediante inyección intraperitoneal de pentotal sódico (50 mg/kg). Inmediatamente después se extrajeron las dos tibias y los dos fémures de cada ratón, de los que se obtuvieron las células totales de la médula ósea del ratón. Estas células fueron cultivadas durante 7 días a 37°C y 5% de CO₂ en un medio selectivo compuesto por: DMEM alto en glucosa, 20% de suero fetal bovino y 30% de sobrenadante de células L-929 (fibroblastos de ratón), como fuente de factor estimulante del crecimiento de macrófagos (M-CSF). Durante estos 7 días los precursores de los macrófagos existentes en la médula ósea se desarrollaron, de manera que transcurrido este tiempo se obtuvo un cultivo confluyente de macrófagos de ratón (Xaus J y col, 2000).

Ensayo de estimulación de los macrófagos

Los macrófagos obtenidos por el procedimiento anterior se cultivaron en placas de 24 pocillos, a razón de 500000 células/pocillo y 500µl del medio selectivo para macrófagos. Tras 1h de incubación para que las células se adhiresen al fondo del pocillo, los macrófagos se estimularon durante 24h con los siguientes compuestos:

- LPS: 100 ng/ml.
- P1, P2 o P3: 100 µg/ml
- LPS (100 ng/ml)+ P1, P2 o P3 (100 µg/ml).

Tras 24h se recogieron los sobrenadantes para la determinación de la concentración de citoquinas por métodos de ELISA comerciales (*Biosource*). Las células se utilizaron para determinar el porcentaje de células fagocíticas, según el método descrito a continuación.

Ensayo de actividad fagocítica

Este ensayo se basa en la capacidad de los macrófagos de fagocitar bacterias. Si éstas están marcadas por fluorescencia, los macrófagos que las han fagocitado pueden detectarse fácilmente por citometría de flujo (Gill HS, 2000).

Se utilizó una cepa de *Escherichia coli* no patógena transformada con el vector que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). 1ml de un cultivo en fase estacionaria de esta bacteria se lavó con 1ml de PBS. Posteriormente las bacterias se resuspendieron en 500µl de PBS, de ahí se añadieron 10 µl a las 500000 células de cada pozo y se incubaron 10min a 37°C. Transcurrido este tiempo se centrifugaron las muestras (2000 rpm, 5min) y tras 2 lavados con PBS, se añadieron 100µl de formaldehído al 4% en PBS para fijar las células. Finalmente las muestras se analizaron por citometría de flujo, con objeto de cuantificar el número de células que habían fagocitado.

8.4.2. Efecto sobre la proliferación de linfocitos:

Se utilizó el protocolo descrito en el apartado 5.1.4, utilizando los siguientes estímulos:

- Con A (5µg/ml).
- LPS (50µg/ml).
- P1, P2 o P3 (100µg/ml).
- P1, P2 o P3 (100µg/ml)+ ConA (5µg/ml).
- P1, P2 o P3 (100µg/ml)+ LPS (50µg/ml).

8.4.3. Determinación de actividad antiinflamatoria por inhibición de metaloproteasas:

Para determinar si los péptidos P1, P2 y P3 eran capaces de inhibir la actividad metaloproteasa, se utilizó un método comercial de selección de inhibidores de MMP-3 (*Oncogene*), siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma breve, este método proporciona un sustrato específico de la MMP-3, que al ser hidrolizado por el enzima da lugar a un producto coloreado, cuya absorbancia se puede medir a 415nm. Los péptidos P1, P2 y P3 (100µg/ml) se incubaron junto con el enzima y su sustrato durante 1h a 37°C. Como control positivo se utilizó un

inhibidor proporcionado por el método comercial y como blanco se utilizó el enzima en ausencia de inhibidor. Transcurrida la hora de incubación se midió la absorbancia a 415nm cada 2 minutos durante 37 minutos.

Resultados

9. ALERGENICIDAD DE LA LECHE DE VACA.

Uno de los principales problemas de la utilización de la leche de vaca en nutrición infantil es la APLV. La leche de cabra ha sido propuesta como sustituto de la de vaca en niños que padecen la APLV, pero los resultados no son buenos en estos niños porque existe una importante reactividad cruzada, debido a la similitud de ambos tipos de proteínas (Carroccio A y col, 1999).

Sin embargo, muy pocos estudios han comparado la alergenidad de las leches de vaca y de cabra en niños no sensibilizados frente a la primera. Por esta razón, el objetivo de nuestro estudio fue analizar la alergenidad de la leche de cabra como primera fuente de proteínas tras el destete.

9.1. Análisis comparativo de la alergenidad de las leches de vaca y cabra

Aunque no existe un modelo animal ideal para el estudio de la alergenidad de un determinado alimento, se utilizó uno anteriormente descrito (Xiu-min Li y col, 1999) que reproduce las características de las reacciones de hipersensibilidad tipo I. La ventaja de este modelo con respecto a otros (Poulsen OM y col, 1987), es que tanto la sensibilización como la reacción alérgica se inducen por ingestión oral, como ocurre en los casos de las alergias alimentarias humanas.

Los animales fueron sensibilizados frente a las PLV o PLC durante 6 semanas, mediante una dosis semanal de dichas proteínas. Para contrarrestar la tendencia a desarrollar tolerancia oral se utilizó como coadyuvante toxina colérica, que está descrito que favorece la respuesta de tipo T_H2 con producción de IgG1 (Snider DP y col, 1994). Además se utilizaron ratones Balb/C que tienen una mayor predisposición a desarrollar respuestas T_H2 que otras razas de ratón (Sun S y col, 2001). Una vez concluida la fase de sensibilización se indujo la reacción alérgica mediante dos dosis orales de PLV o PLC y ,una vez analizados los síntomas, los animales fueron sacrificados.

9.1.1. Evaluación del estado de los animales:

La presencia de diarrea, uno de los síntomas más frecuentes de la APLV, se debe principalmente al aumento de permeabilidad provocado por la respuesta inmunitaria que desencadenan las proteínas lácteas. Este síntoma fue evaluado semanalmente y empezó a aparecer 7 días después de la primera dosis de sensibilización.

El porcentaje de ratones con diarrea fue superior en los ratones sensibilizados con leche de vaca que en los del grupo CB ($P < 0.05$) (tabla 9-1). En todos los casos la diarrea fue leve y no causó pérdida de peso en ningún grupo (figura 9-1). Tampoco esperábamos que la diarrea fuera más severa durante la fase de sensibilización.

Grupo	Nº de ratones	%
C	0 / 13	0
CT	3 / 13	23,1
V	8 / 13	61,5 *
CB	1 / 13	7,7 †

Tabla 9-1. Nº de ratones con diarrea. La presencia de diarrea fue evaluada semanalmente y los animales que la sufrieron durante dos semanas consecutivas fueron considerados casos positivos. C: control, CT: control toxina, V: ratones sensibilizados frente a leche de vaca, CB: ratones sensibilizados frente a leche de cabra. *: $P < 0,05$ vs C y CT. †: $P < 0,05$ vs V.

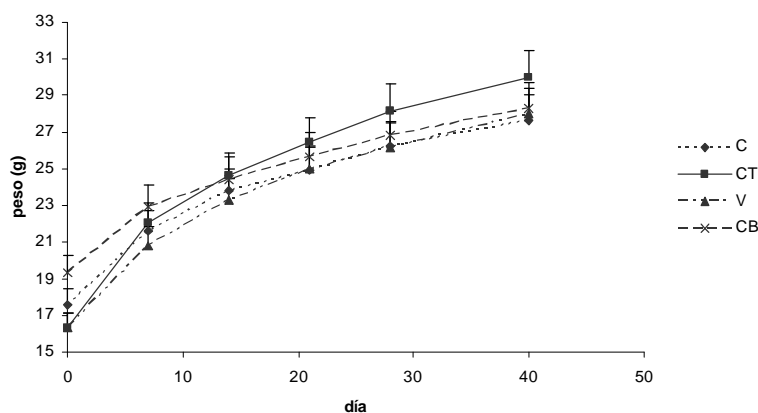


Figura 9-1. Evolución del peso de los ratones a lo largo del estudio. Los animales se pesaron semanalmente. Los valores representan la media \pm EEM (n=13).

Tras las 5 dosis de sensibilización, los ratones se sometieron a 2 dosis de choque para desencadenar la reacción alérgica. Entre 15 y 30 minutos después de la última de estas dosis, empezaron a aparecer los síntomas, que se evaluaron mediante un sistema de puntuación (figura 9-2). El valor medio de la puntuación de los síntomas fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en el grupo V comparado con el grupo CB ($2,923 \pm 1,115$ vs $1,153 \pm 1,068$), lo cual coincide con lo observado para la diarrea. Algunos ratones del grupo CT, que no se habían sensibilizado frente a proteínas de leche, sufrieron síntomas leves ($0,615 \pm 0,506$). Esto podría ser debido a reacciones alérgicas leves frente a alérgenos de la dieta, como consecuencia de la inmuno-estimulación provocada por la toxina colérica. La puntuación de los síntomas en el grupo CB no fue estadísticamente diferente a la del grupo CT.

Estos resultados, junto con el porcentaje de ratones con diarrea, sugieren una menor sensibilización de los ratones del grupo CB y en consecuencia una reacción alérgica más leve tras la dosis de choque.

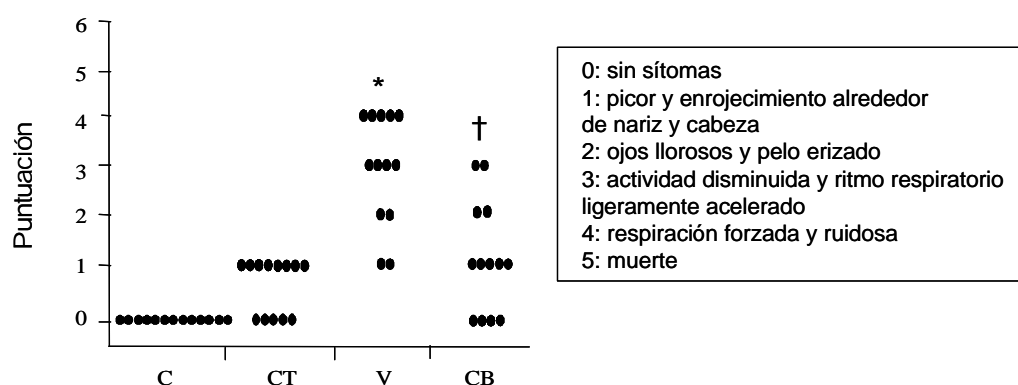


Figura 9-2. Puntuación de los síntomas de hipersensibilidad. Entre 15-30 minutos después de la segunda dosis de choque se evaluó el estado de los animales ($n=13/\text{grupo}$) según el sistema descrito en el recuadro de la figura. *: $P < 0,05$ vs C y CT. †: $P < 0,05$ vs V.

Una vez evaluados los síntomas y transcurridos 30 minutos desde la última dosis de choque, los animales fueron sacrificados y el intestino se extrajo y se pesó. La relación peso intestino/peso ratón fue significativamente mayor en el grupo V ($0,113 \pm 0,008$) comparado con el grupo CB ($0,100 \pm 0,009$) ($P=0,02$) y con el grupo CT ($0,098 \pm 0,004$) ($P=0,01$). Sin embargo no se observó ni edema ni ulceración en ninguno de los intestinos. Esto podría indicar una inflamación

intestinal leve en el grupo V, lo que coincide con el mayor porcentaje de animales con diarrea en este grupo.

9.1.2. Papel de los linfocitos en el desarrollo de la APLV:

Está descrito que los linfocitos y las citoquinas juegan un importante papel en las enfermedades alérgicas, como por ejemplo en el asma (Lukacs NW, 1994). Por esta razón decidimos analizar el papel de los linfocitos en este modelo de APLV. Para ello, el bazo de los ratones se extrajo y a partir de él se aislaron los linfocitos que fueron cultivados para llevar a cabo ensayos de proliferación y conocer su respuesta frente a diferentes estímulos.

Así, los linfocitos de los ratones del grupo V incrementaron su proliferación cuando las PLV se añadieron al medio de cultivo (figura 9-3). Sin embargo, la adición de PLC no provocó un aumento de la proliferación de los ratones del grupo CB. El aumento de la proliferación observado en el grupo V no se puso de manifiesto ni en el peso ni en el número de células del bazo (tabla 9-2), lo cual indica que los linfocitos que están sensibilizados frente a las PLV representan un pequeño porcentaje respecto al total. Probablemente el número de linfocitos sensibilizados frente a PLV sería mayor en los nódulos mesentéricos, que es donde se produce el proceso de reconocimiento de la proteína y proliferación de linfocitos, cuando los alérgenos entran por vía oral. Posteriormente estos linfocitos migran al bazo a través del sistema linfático, por lo que la composición de este órgano refleja lo que ocurre en dichos nódulos.

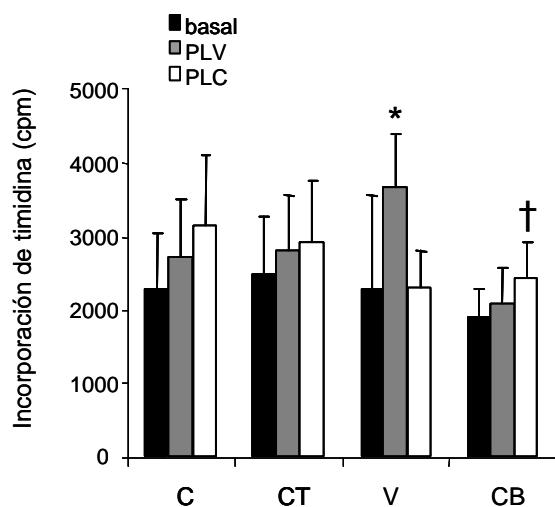


Figura 9-3. Ensayo de proliferación de linfocitos. Los linfocitos aislados del bazo se cultivaron en ausencia (basal) o presencia de proteínas de leche de vaca (PLV) (100µg/ml) o de cabra (PLC) (100µg/ml). [³H]-timidina (1µCi/ml) se añadió al medio y se incubó durante 48h. El grado de proliferación se determinó según la timidina incorporada. Los resultados se expresan como valor medio de incorporación de timidina (cpm) ± EEM (n=13). * P<0,05 vs C y CT, † P<0,05 vs V.

	Peso bazo (mg)	N ^o de células (millones)/mg de bazo
CT	100 ± 17	0,53 ± 0,1
V	104 ± 13	0,60 ± 0,2
CB	96 ± 21	0,60 ± 0,2

Tabla 9-2. Peso y número de células del bazo. Inmediatamente tras el sacrificio se extrajo el bazo de cada ratón y se pesó. Tras lisar los eritrocitos se hizo un recuento de las células presentes en el bazo. Los valores representan la media ± EEM (n=13).

También se analizó el perfil de citoquinas que producían estos linfocitos en presencia de un estímulo específico de linfocitos T (Con A, 5µg/ml), para analizar qué tipo de repuesta linfocitaria era responsable del desarrollo de la APLV. La figura 9-4 muestra los resultados más destacados. Los niveles de IL-4, citoquina T_H2, fueron significativamente mayores en los linfocitos del grupo V, respecto a los del grupo CB y CT (figura 9-4A). Además, la producción de IFN-γ, citoquina T_H1, fue significativamente inferior en los ratones sensibilizados frente a PLV (figura 9-4C) respecto a los que recibieron PLC.

Por otra parte, el análisis de la expresión de citoquinas por RT-PCR, mostró resultados similares, es decir, una mayor expresión de IL-4 y menor de IFN-γ en los linfocitos del grupo V estimulados con Con A (figura 9-4B y D).

A la vista de estos resultados, parece que la reacción alérgica se produce como consecuencia de un desequilibrio de la respuesta inmunitaria hacia T_H2. Los ratones sensibilizados frente a las proteínas de vaca presentan una mayor producción de citoquinas T_H2, mientras que tienen disminuida la respuesta T_H1. Este efecto no se da en ratones sensibilizados frente a la leche de cabra, lo que sugiere una menor capacidad de sensibilización de las PLC.

9.1.3. Parámetros plasmáticos:

Con objeto de estudiar los efectos sistémicos de la sensibilización y posterior reacción alérgica, se obtuvo el plasma de cada ratón inmediatamente tras su sacrificio.

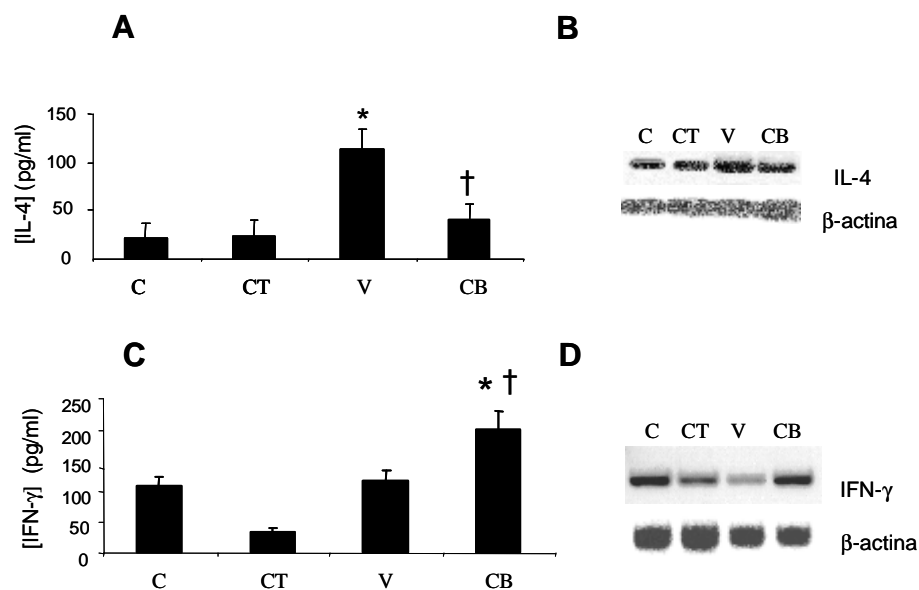


Figura 9-4. Producción de citoquinas por linfocitos T. Los linfocitos aislados a partir del bazo se cultivaron durante 48h en presencia o ausencia de ConA (5µg/ml). Transcurrido ese tiempo se recogieron los sobrenadantes en los que se midió por un método de ELISA comercial la concentración de IL-4 (A) e IFN-γ (C). Los resultados se expresan como valor medio (pg/ml) ± EEM (n=13). El ARNm de los linfocitos se extrajo y se utilizó para analizar por RT-PCR la expresión del gen de la IL-4 (B) y del IFN-γ (D). *:P<0,05 vs C y CT. †: P<0,05 vs V.

En el ratón tanto la IgG1 como la IgE tienen la función que en el humano desempeña exclusivamente la IgE. En la superficie de mastocitos y basófilos, llamados células efectoras, existen receptores específicos para la fracción constante (Fc) de estas inmunoglobulinas. Así, en un proceso de sensibilización estos anticuerpos específicos frente a la proteína sensibilizante se sintetizan y se unen a sus receptores en mastocitos y basófilos. Posteriormente, la dosis de choque desencadena el reconocimiento del antígeno por parte de las inmunoglobulinas adheridas a las células efectoras, lo que provoca su entrecruzamiento y la consiguiente desgranulación de dichas células, con liberación de mediadores de los síntomas de la alergia.

Como se muestra en la figura 9-5A, la leche de vaca indujo una mayor síntesis de IgG1-específicas frente a PLV comparada con los grupos C y CT. Sin embargo, la leche de cabra no produjo un aumento en la síntesis de IgG1-específicas frente a PLC. Esto indica una menor capacidad de sensibilización de las PLC, como también se vio anteriormente con la menor proliferación de linfocitos inducida por estas proteínas (figura 9-3). Como se observa en la figura, las IgG1 específicas frente a leche de vaca también son capaces de reconocer

PLC, lo que indica una reactividad cruzada entre ambos tipos de proteínas. Los niveles de IgG1 totales no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos.

Los niveles plasmáticos de histamina, el principal mediador de los síntomas de la alergia, fueron significativamente mayores en el grupo V comparado con los grupos C y CT (figura 9-5B). Sin embargo los niveles de histamina de ratones sensibilizados frente a PLC fueron similares a los de los dos grupos control. Este resultado es coherente con la menor concentración plasmática de IgG1 específica en estos ratones, ya que el reconocimiento del antígeno por parte de la IgG1 es lo que desencadena la liberación de histamina.

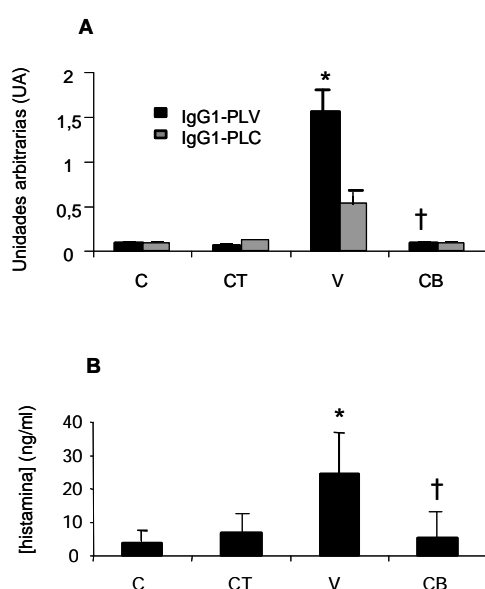


Figura 9-5. Efectos sistémicos de la APLV. (A) 30 minutos después de la segunda dosis de choque se extrajo el plasma de los ratones y se determinó la concentración de IgG1 específica frente a proteínas de leche de vaca (PLV) o de cabra (PLC). Los valores representan la media (unidades de densidad óptica) \pm EEM (n=13). (B) En estas mismas muestras de plasma se determinó la concentración de histamina (ng/ml) por un método comercial de ELISA. Los valores representan la media \pm EEM (n=13). *:P<0,05 vs C y CT. †: P<0,05 vs V.

La histamina es uno de los principales responsables de los síntomas de la alergia, y así se pudo comprobar en nuestro estudio, ya que los ratones con una mayor concentración de histamina fueron también los que tuvieron una mayor puntuación en el sistema de evaluación de los síntomas (r de Spearman=0.520, P<0.05) (figura 9-6).

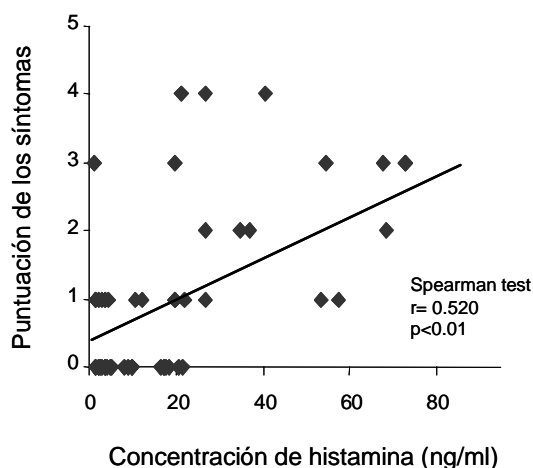


Figura 9-6. Correlación entre la puntuación de los síntomas y la concentración plasmática de histamina en ratones alérgicos a las proteínas de la leche de vaca o de cabra. La significación estadística ($P < 0,05$) se calculó mediante el test de Spearman así como el coeficiente de correlación (r). Cada punto negro representa un ratón ($n=49$).

9.1.4. Resumen de los resultados:

Hasta el momento este es el primer estudio animal en el que se compara la alergenidad de la leche de vaca y la de cabra en animales al destete, es decir, no sensibilizados previamente frente a las proteínas de la leche de vaca.

En anteriores estudios se había evaluado la leche de cabra como alternativa a la de vaca en niños con APLV diagnosticada (Carroccio A y col, 1999). Sin embargo los resultados no fueron buenos, debido a la existencia de reactividad cruzada entre ambos tipos de proteína. Las inmunoglobulinas que reconocen a las PLV también pueden reconocer a las PLC, y por tanto una vez que el niño está sensibilizado frente a PLV, la leche de cabra no es una alternativa válida.

Sin embargo, en este estudio se compara la alergenidad de ambas leches en animales justo al destete, es decir, que sólo han estado en contacto con proteínas de la leche de su madre, y que por tanto, no están sensibilizados frente a PLV ni PLC.

Como demuestran los resultados, se trata de un modelo de sensibilización por el que administrando a los ratones proteínas alérgicas se consigue estimular la proliferación de linfocitos T y desequilibrar la respuesta inmunitaria hacia el tipo T_H2 . Este desequilibrio origina una mayor producción de IL-4 que, como es ampliamente conocido (Paul WE, 1999), induce la síntesis de IgG1 por los linfocitos B.

Durante las 6 semanas del estudio, la administración de PLV (grupo V) indujo una sensibilización de los ratones que se puso de manifiesto en los síntomas (diarrea y puntuación), en la respuesta linfocitaria (proliferación y producción de citoquinas) y en los parámetros plasmáticos (IgG1 e histamina). Sin embargo, las PLC (grupo CB) no indujeron una sensibilización tan marcada, como se demuestra por los resultados obtenidos, que fueron en todos los casos muy similares a los de los ratones no sensibilizados frente a proteínas de la leche (grupos C y CT).

9.2. Influencia de la relación caseínas/proteínas del lactosuero (C/PL) en la alergenicidad de la leche de vaca.

La composición proteica de una determinada leche juega un papel fundamental en su alergenicidad. De hecho, leches de diferentes mamíferos, a pesar de tener una composición proteica global similar, tienen diferentes capacidades de sensibilización (Restani P y col, 1999). Por otra parte diferentes estudios demuestran que la mayoría de niños que sufren APLV sintetizan anticuerpos frente a la α 1-caseína de la leche de vaca (Hill DJ, 1996), lo que quiere decir que esta proteína es uno de los más importantes alérgenos de la leche bovina. La leche de cabra, que como se ha visto en el apartado anterior es menos alérgica, tiene un menor contenido en esta proteína. Por tanto, nos planteamos si una menor proporción en caseínas podría reducir la alergenicidad de la leche de vaca.

Por esta razón, decidimos utilizar el mismo modelo animal del apartado 9.1 para evaluar la alergenicidad de una leche de vaca con menor contenido en caseínas. Para ello, manteniendo la concentración proteica global se modificó la relación C/PL desde un valor inicial de 80/20 a un valor 40/60, que es el mismo de la leche materna. En este caso, y una vez comprobado que no había diferencias importantes entre los grupos C y CT, se utilizó sólo el control con toxina colérica (CT).

9.2.1. Modificación de la relación C/PL de la leche de vaca:

La adición de proteínas del lactosuero a una leche de vaca (apartado 5.2.1.) dio como resultado una leche con la misma concentración proteica pero diferente relación C/PL. Como se muestra en la figura 9-7, el análisis de las proteínas de ambas leches por SDS-PAGE dio como resultado un menor contenido en caseínas de la leche modificada, mientras que el contenido en proteínas del lactosuero fue mayor que el de la leche de vaca. Sin embargo, el contenido proteico global, determinado por el método Kjeldhal, fue el mismo en las dos leches ($29,4 \pm 1,0$ para la leche de vaca nativa y $29,0 \pm 1,0$ para la leche modificada).

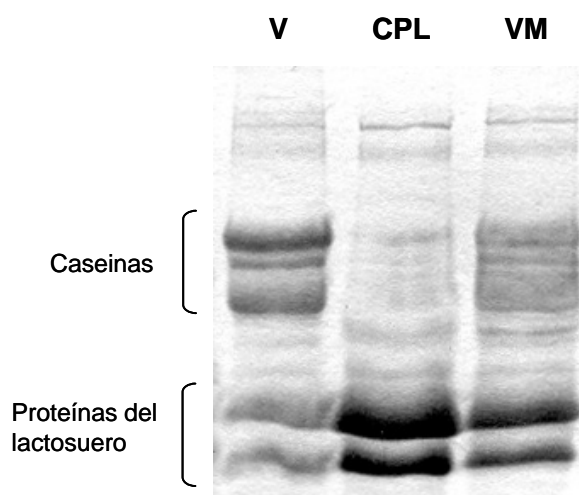


Figura 9-7. SDS-PAGE de las proteínas (25 μ g de proteínas/muestra) de dos muestras de leche y de un concentrado de proteínas del lactosuero utilizado para modificar la relación C/PL de la leche de vaca. Las bandas de proteínas se muestran en orden creciente de peso molecular. V: leche de vaca nativa, CPL: concentrado de proteínas del lactosuero, VM: leche de vaca modificada.

9.2.2. Evaluación del estado de los animales:

El porcentaje de ratones en los que se observó diarrea dos veces consecutivas se muestra en la tabla 9-3. En el grupo V la frecuencia de diarrea fue significativamente superior que en los grupos CT y VM. Aunque, como ya ocurrió en el experimento descrito anteriormente (ver apartado 9.1.1), la diarrea fue en todos los casos leve y no afectó al peso de los animales.

La relación peso intestino/peso ratón confirmó una leve inflamación intestinal, sin ulceración ni edema, en los ratones del grupo V ($0,12 \pm 0,01$ vs $0,10 \pm 0,01$ para CT y VM), lo que coincide con la mayor frecuencia de diarrea en este grupo.

El estado de los animales, evaluado durante los 30 minutos posteriores a la segunda dosis de choque (figura 9-8), muestra que los animales del grupo V fueron los que tuvieron síntomas más graves, con una puntuación media significativamente mayor que la de los grupos CT ($3,1 \pm 1,1$ vs $0,6 \pm 0,5$). Sin embargo la puntuación de los animales del grupo VM ($1,1 \pm 0,1$) fue significativamente menor que la del grupo V, pero no diferente respecto a la del grupo CT.

Grupo	Nº de ratones	%
CT	1 / 8	12,5
V	5 / 8	62,5 *
VM	2 / 8	25[†]

Tabla 9-3. Nº de ratones con diarrea. La presencia de diarrea fue evaluada semanalmente y los animales que la sufrieron durante dos semanas consecutivas fueron considerados casos positivos. CT: control toxina, V: ratones sensibilizados frente a leche de vaca, VM: ratones sensibilizados frente a leche de vaca modificada. *: $P < 0,05$ vs CT. †: $P < 0,05$ vs V.

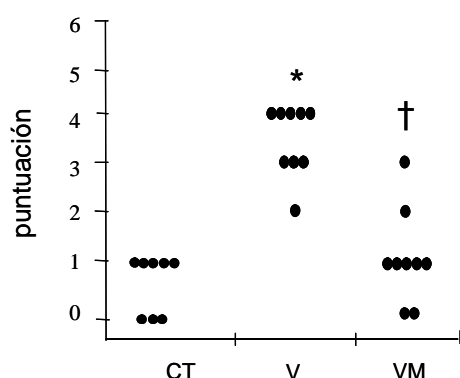


Figura 9-8. Puntuación de los síntomas de hipersensibilidad. Entre 15 y 30 minutos después de la segunda dosis de choque se evaluó el estado de los animales según el sistema descrito en el apartado 5.1.2. Cada punto representa a un ratón. *: $P < 0,05$ vs CT. †: $P < 0,05$ vs V.

9.2.3. Respuesta de los linfocitos:

Como ya se vio en el apartado anterior (9.1.2) los linfocitos juegan un papel muy importante en este modelo animal de atopía. La figura 9-9, muestra que los linfocitos de los ratones sensibilizados frente a la leche de vaca nativa, aumentaron su índice de proliferación cuando las PLV fueron añadidas al medio de cultivo. Sin embargo, el índice de proliferación de los linfocitos CT y VM no se modificó significativamente en presencia de PLV. Esto indica que la leche de vaca nativa tiene una mayor capacidad de sensibilización de linfocitos que la leche de

vaca modificada. Aunque, como ya se comentó anteriormente, el número de linfocitos sensibilizados frente a las PLV a nivel del bazo supone un pequeño porcentaje respecto al total. De ahí que el índice de estimulación sea bajo y que no se modificara el peso ni el número de células del bazo.

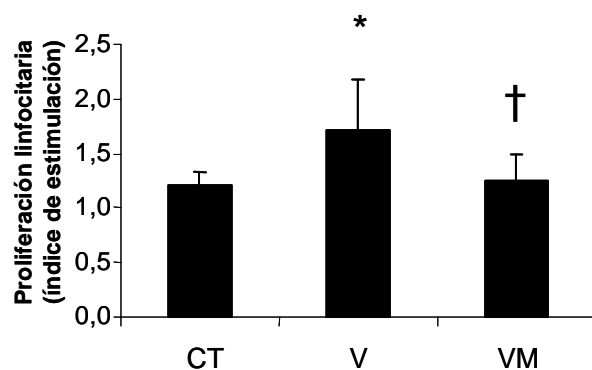


Figura 9-9. Ensayo de proliferación de linfocitos. Los linfocitos aislados del bazo se cultivaron en ausencia (basal) o presencia de proteínas de leche de vaca (PLV) (100µg/ml) o de cabra (100µg/ml). [³H]-timidina (1µCi/ml) se añadió al medio y se incubó durante 48h. El grado de proliferación se determinó según la timidina incorporada. Los resultados se expresan como valor medio del índice de proliferación ± EEM (n=8). *: P<0,05 vs CT. †: P<0,05 vs V.

El análisis del patrón de citoquinas expresado no mostró en este caso diferencias significativas entre los linfocitos de los distintos grupos. La producción de IL-4 fue superior en el grupo V, pero no alcanzó diferencia significativa (P=0,07) (datos no mostrados). Por tanto, el desplazamiento hacia una respuesta linfocitaria de tipo T_H2 que se observó en el experimento anterior, no fue tan evidente en este caso.

9.2.4. Parámetros plasmáticos:

A pesar de que la respuesta de linfocitos no se modificó de forma evidente sí se manifestaron los efectos sistémicos de la sensibilización y posterior reacción alérgica. Así, la figura 9-10A muestra los niveles de IgG1-específica frente a PLV en los ratones de diferentes grupos. Se observa que la sensibilización de ratones frente a leche de vaca con una relación C/PL 80/20 indujo una producción sistémica de IgG1-específicas frente a PLV significativamente superior a la de los grupos CT y VM. Además los niveles plasmáticos de histamina en el grupo V fueron también significativamente mayores que los de los grupos CT y VM (figura 9-10B).

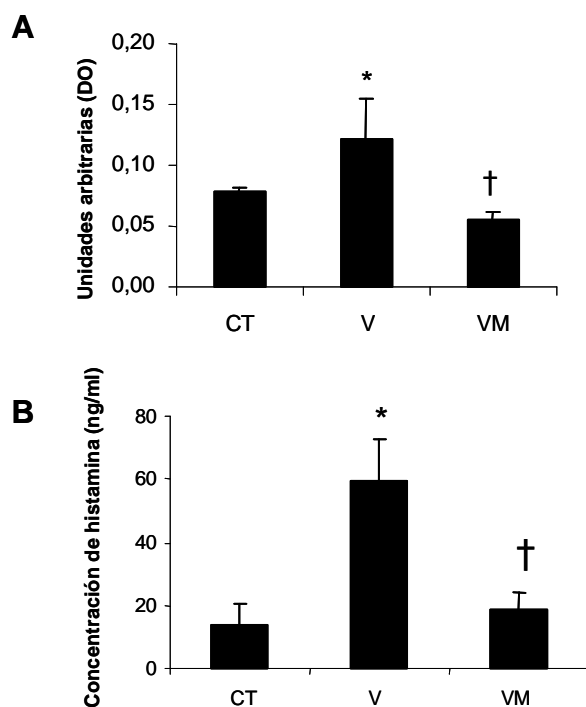


Figura 9-10. Parámetros plasmáticos. (A) 30 minutos después de la segunda dosis de choque se extrajo el plasma de los ratones y se determinó la concentración de IgG1 específica frente a proteínas de leche de vaca (PLV). Los valores representan la media (unidades de densidad óptica) \pm EEM (n=8). (B) En estas mismas muestras de plasma se determinó la concentración de histamina (ng/ml) por un método comercial de ELISA. Los valores representan la media \pm desviación estándar. *:P<0,05 vs CT. †: P<0,05 vs V.

Como ya ocurrió en el experimento anterior (ver 9.1.3) los ratones con una mayor concentración plasmática de histamina fueron los que tuvieron una puntuación de los síntomas más alta (figura 9-11). Este resultado vuelve a demostrar que en este modelo la histamina es responsable de los síntomas de la reacción alérgica.

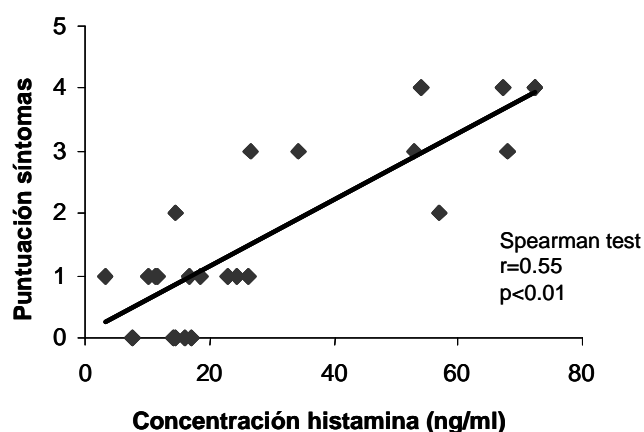


Figura 9-11. Correlación entre la puntuación de los síntomas y la concentración plasmática de histamina en los tres grupos del estudio (CT, V, VM). La significación estadística (P<0,05) se calculó mediante el test de Spearman así como el coeficiente de correlación (r). Cada punto negro representa un ratón (n=21).

9.2.5. Resumen de los resultados:

En este experimento se demuestra la importancia de la relación C/PL en la alergenidad de la leche de vaca. La leche de vaca nativa, con una relación C/PL de 80/20 tiene una mayor capacidad de sensibilizar a los ratones en el modelo de APLV utilizado.

De nuevo la mayor capacidad de sensibilización de la leche de vaca no modificada se puso de manifiesto en el mayor porcentaje de ratones con diarrea y en la puntuación de los síntomas de la reacción alérgica. Además, los linfocitos de los ratones del grupo V aumentaron su proliferación en presencia de PLV, lo que también indica que estaban más sensibilizados que los del grupo VM.

Sin embargo, en este caso el desequilibrio de la respuesta linfocitaria no fue tan claro como en el estudio anterior. Esto podría deberse a que el número de ratones utilizado fue inferior (n=8 frente a n=13), y quizás insuficiente para ver diferencias significativas en el patrón de citoquinas de los linfocitos, aunque que sí se observó una tendencia hacia una mayor respuesta T_H2 en los linfocitos del grupo V (P= 0,07 vs VM).

No obstante, aunque con los datos obtenidos a nivel de bazo no sea muy evidente, los parámetros plasmáticos (producción de IgG1 y de histamina) mostraron que sí se indujo una mayor respuesta sistémica en ratones sensibilizados frente a leche de vaca 80/20 respecto a los que recibieron leche de vaca 40/60.

9.3. *Influencia de la APLV sobre posteriores fenómenos de alergia.*

En este apartado el objetivo fue ir un poco más allá del fenómeno de APLV y evaluar la influencia de éste sobre posteriores fenómenos de alergia, ya que se ha demostrado que los niños que padecen APLV tienen una mayor probabilidad de sufrir posteriores fenómenos de alergia frente a alérgenos diferentes a las PLV (Guillet G y col, 1992).

Con este objetivo en una primera fase del estudio los ratones se hicieron alérgicos a las PLV. Una vez que los ratones habían sido sensibilizados, en una segunda fase los animales recibieron por vía oral una proteína de elevada alergenidad (ovoalbúmina, OVA), para comprobar si la inmuno-estimulación provocada por la fase de sensibilización frente a PLV influía en que los ratones

reaccionaran frente a dicha proteína. De esta forma podríamos comprobar si la menor alergenicidad de la leche de cabra influía también en posteriores sensibilizaciones.

9.3.1. Inducción de sensibilización frente a proteínas lácteas:

Aunque ya se había comprobado que la pauta de sensibilización utilizada provocaba APLV en los ratones, la mitad de los animales de este estudio se sacrificaron a los 42 días, antes de administrar la OVA, para confirmar que el modelo había funcionado.

En la tabla 9-4 se recogen los principales resultados obtenidos durante esta primera fase del estudio. Los resultados fueron muy similares a los descritos en el apartado 9.1, con un aumento de los niveles plasmáticos de IgG1 específica frente a las proteínas lácteas significativamente mayor en el grupo V respecto al CB. De nuevo se observó un desequilibrio hacia una respuesta T_H2 en los ratones del grupo V, como se demuestra por la mayor concentración plasmática de IL-4 y menor de IFN- γ . Por tanto, se puede concluir que los ratones del grupo V mostraron estar sensibilizados frente a las PLV, mientras que la sensibilización inducida por la leche de cabra fue menor.

Grupo	Puntuación	[IgG1-específica] (D.O.)	[IL-4] plasma (pg/ml)	[IFN-g] plasma (pg/ml)
CT	0,65 \pm 0,48	0,049 \pm 0,013	1,16 \pm 0,17	70,06 \pm 10,17
V	3,26 \pm 1,07*	0,295 \pm 0,192*	79,02 \pm 12,2*	106,3 \pm 11,8*
CB	1,12 \pm 0,99†	0,055 \pm 0,04†	1,12 \pm 0,100†	204,2 \pm 25,1†

Tabla 9-4. Resultados de la primera etapa del estudio en la que se sensibilizó a ratones frente a PLV (grupo V) o PLC (grupo CB). Los valores representan la media \pm EEM (n=8).

9.3.2. Influencia sobre la sensibilización frente a otros alérgenos:

Una vez que se los animales se habían sensibilizado frente a las proteínas de la leche, se les puso en contacto con otra proteína altamente alergénica (OVA) mediante una dosis oral de dicha proteína. A los 15 días, y con objeto de comprobar si los ratones se habían sensibilizado frente a la OVA, se administró una dosis de choque intraperitoneal con esta misma proteína y se observaron los síntomas de los animales.

Los síntomas de la reacción alérgica fueron significativamente más graves en el grupo V con una puntuación media de $(3,75 \pm 0,957)$ respecto al grupo control $(0,76 \pm 0,251)$ y CB $(1,86 \pm 0,752)$. Este resultado indica que se produjo una reacción alérgica más grave en el grupo V, lo que sugiere una mayor sensibilización frente a OVA que en el grupo CB.

Tras el sacrificio se determinó la concentración plasmática de IgG1 específicas frente a OVA. La figura 9-12 muestra cómo los ratones control, que no sufrieron sensibilización frente a ninguna de las proteínas de la leche, apenas sintetizaron IgG1 frente a OVA. Sin embargo, en los grupos V y CB la concentración plasmática de estas Ig fue significativamente superior, lo que sugiere una influencia de la sensibilización frente a las proteínas de la leche en posteriores procesos de sensibilización. De acuerdo con la mayor gravedad de los síntomas, los ratones del grupo V mostraron una concentración plasmática de IgG1- OVA específica significativamente mayor que los del grupo CB.

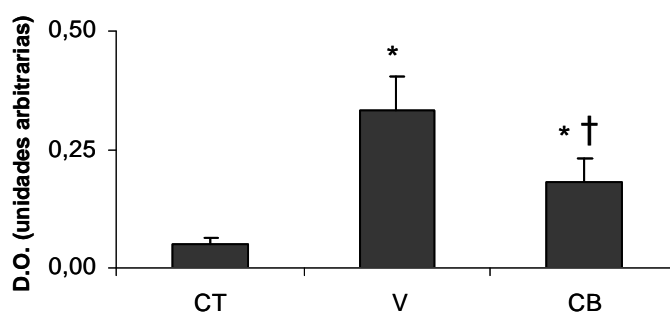


Figura 9-12. Concentración plasmática de IgG1 específica frente a OVA. 30 minutos después de la dosis de choque intraperitoneal con OVA se extrajo el plasma de los ratones y se determinó la concentración de IgG1 específica frente a OVA. Los valores representan la media \pm EEM (n=8). * $P < 0,05$ vs CT, † $P < 0,05$ vs V.

9.3.3. Resumen de los resultados:

Durante el proceso de sensibilización frente a un alérgeno, el sistema inmunitario está normalmente estimulado, y por esta razón se facilita la sensibilización frente a otros alérgenos que en ese momento están en contacto con el organismo.

Así, durante el proceso de sensibilización frente a las proteínas de la leche los ratones entraron en contacto con la OVA, y una sola dosis de esta proteína

provocó la sensibilización. A pesar de que se han analizado muy pocos parámetros, los resultados sugieren que la menor sensibilización provocada por las proteínas de la leche de cabra, tuvo una cierta influencia en el desarrollo de alergia frente a otros antígenos.

Se trata de unos resultados muy preliminares, pero que sugieren la importancia de la APLV en posteriores fenómenos de alergia. Evitando la sensibilización del recién nacido frente a las proteínas de la leche de vaca se podría conseguir reducir la incidencia de otros fenómenos de alergia en edades más avanzadas.

9.4. Hidrólisis de las proteínas lácteas por probióticos y efectos sobre su alergenidad.

La alternativa a la leche de vaca más utilizada en niños con APLV consiste en fórmulas infantiles con las proteínas hidrolizadas enzimáticamente, de manera que el tamaño de los péptidos no sea suficiente para inducir una sensibilización. En función de que el tratamiento empleado sea más o menos intenso, se obtendrán fórmulas extensamente hidrolizadas o bien parcialmente hidrolizadas (ver apartado 4.1.3). La diferencia entre ambos tipos de fórmulas radica en el tamaño de los péptidos finales, de manera que en el primer caso éste es tal que ni inducen sensibilización ni tampoco tolerancia, mientras que en el segundo caso los péptidos sí inducen cierta tolerancia, pero existe un riesgo de sensibilización.

Dado que las bacterias probióticas tienen enzimas proteolíticas decidimos hidrolizar las proteínas de la leche de vaca utilizando estas bacterias y comprobar la alergenidad del hidrolizado resultante. Además diferentes estudios sugieren un posible papel beneficioso de los probióticos en la APLV (Moro Ge y col, 2002), y por ello se analizó también el efecto de la simple presencia de probióticos sobre la sensibilización frente a las PLV.

9.4.1. Hidrólisis enzimática y por probióticos de las proteínas de la leche de vaca:

Tras someter a la leche de vaca a una hidrólisis enzimática o por probióticos, se analizó la distribución de pesos moleculares de los hidrolizados resultantes por cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC).

La figura 9-13 muestra los resultados, en los que se puede ver cómo la hidrólisis enzimática (VH) fue más extensa que la conseguida con bacterias probióticas (VF). La diferencia es que en el segundo caso el grado de hidrólisis fue menor, de manera que, aunque el peso molecular de aproximadamente el 80% de los péptidos obtenidos fue menor de 1000 Da, hubo un 20% de péptidos entre 6000 y 1000 Da. Sin embargo, en el caso de la leche hidrolizada enzimáticamente más del 98% de los péptidos estaban por debajo de 1000Da. En ambos casos hubo un 1% de péptidos por encima de 6000 Da.

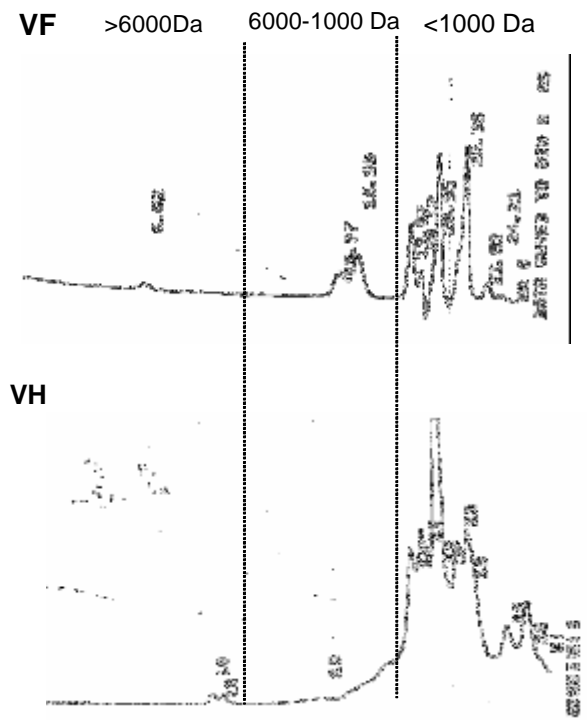


Figura 9-13. Análisis de la distribución de pesos moleculares de los productos obtenidos por hidrólisis enzimática (VH) o por probióticos (VF). Se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPL).

9.4.2. Evaluación del estado de los animales:

Tras la dosis de choque los ratones sensibilizados frente a PLV (grupo V) fueron los que tuvieron unos síntomas más graves, con una puntuación media mayor que la del resto de grupos (figura 9-14). Los ratones que recibieron PLV sin hidrolizar junto con probióticos (grupo V+PRO) tuvieron una puntuación más alta que el control pero ligeramente inferior a la del grupo V. Los animales que

recibieron proteínas hidrolizadas bien con probióticos (grupo VF) o por acción de enzimas comerciales (grupo VH) fueron los que mostraron unos síntomas más leves tuvieron síntomas más leves. Por tanto, los síntomas de la reacción alérgica fueron más graves en el grupo V, pero también se manifestaron en el resto de grupos sensibilizados, especialmente en el grupo V+PRO.

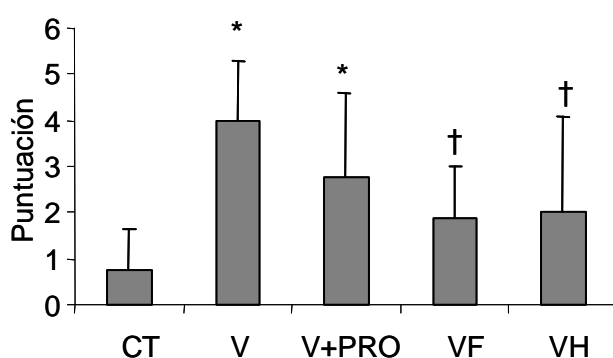


Figura 9-13. Puntuación de los síntomas de hipersensibilidad. Entre 15-30 minutos después de la segunda dosis de choque se evaluó el estado de los animales según el sistema descrito en el apartado 5.1.2. Los valores representan la media ± EEM (n=8) *: P<0,05 vs CT. †: P<0,05 vs V.

9.4.3. Parámetros plasmáticos:

La leche de vaca no hidrolizada indujo un aumento de los niveles de IgG1 específica para PLV comparado con el resto de grupos (figura 9-15A). Sin embargo, la hidrólisis por probióticos y por el enzima comercial redujo la capacidad de sensibilización de la leche, como se observa por los niveles de IgG1 específica, que fueron significativamente inferiores a los observados en los grupos V y V+PRO. En el caso del hidrolizado por probióticos los niveles de esta inmunoglobulina ni siquiera mostraron diferencias con respecto a los de ratones no sensibilizados (grupo CT).

Los niveles plasmáticos de IgE total (el método de ELISA no fue lo suficientemente sensible como para detectar las IgE-PLV específicas) también fueron más elevados en los ratones de los grupos que recibieron leche no hidrolizada (figura 9-15B). Estos resultados sugieren una inducción de la respuesta T_H2 por la leche de vaca no hidrolizada, que no se observó tras la hidrólisis proteica por los dos métodos utilizados.

Para confirmar esta hipótesis se determinaron los niveles plasmáticos de IL-4, citoquina T_H2 (figura 9-15C). Se observaron niveles muy elevados de IL-4 en el grupo V, lo que confirma la inducción de la respuesta T_H2 antes comentada. Sin

embargo, los niveles de esta citoquina en los grupos V+PRO, VF y VH fueron significativamente menores respecto a los del grupo V. por los valores de IgG1 específica e IgE, cabría esperar una mayor inducción de la respuesta T_H2 en el grupo V+PRO, pero probablemente la presencia de los probióticos en la leche administrada a los ratones de este grupo habría favorecido el equilibrio entre las respuestas T_H1 y T_H2, ya que las bacterias estimulan la respuesta T_H1.

Los ratones de los grupos V y V+PRO, que mostraron una respuesta sistémica más importante (mayores niveles plasmáticos de IgG1 e IgE) y unos síntomas más graves, fueron los que tuvieron mayores niveles plasmáticos de histamina (datos no mostrados). Este resultado demuestra una vez más que la histamina es el principal mediador de los síntomas en nuestro modelo de APLV.

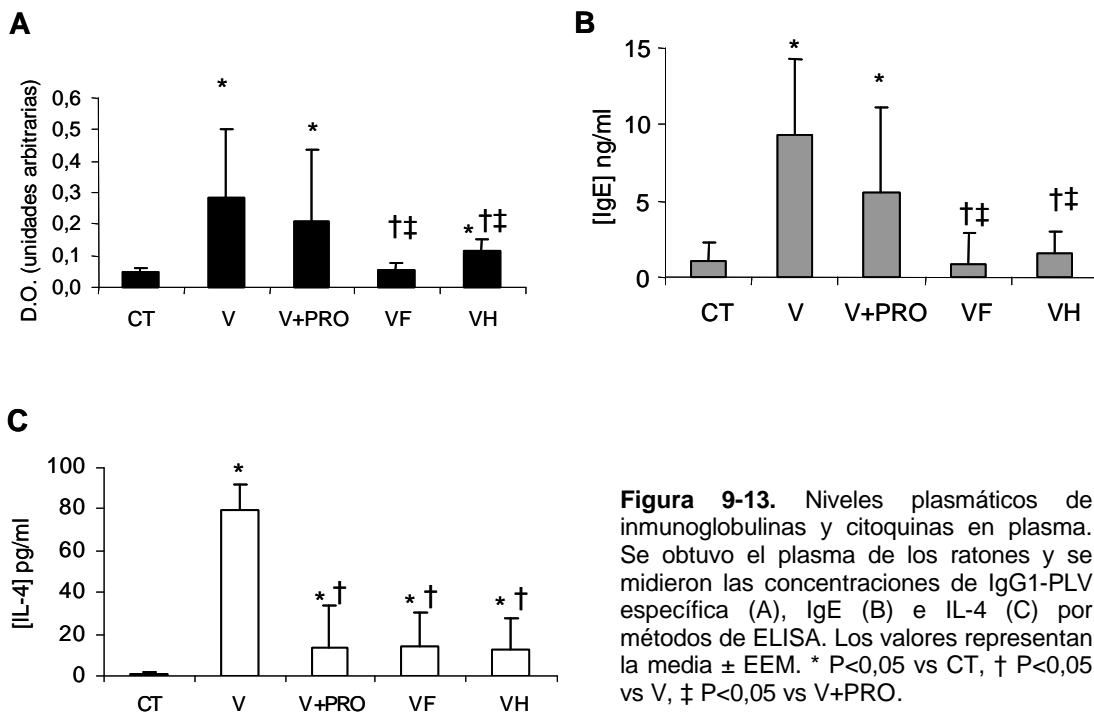


Figura 9-13. Niveles plasmáticos de inmunoglobulinas y citoquinas en plasma. Se obtuvo el plasma de los ratones y se midieron las concentraciones de IgG1-PLV específica (A), IgE (B) e IL-4 (C) por métodos de ELISA. Los valores representan la media ± EEM. * P<0,05 vs CT, † P<0,05 vs V, ‡ P<0,05 vs V+PRO.

9.4.4. Resumen de los resultados:

El objetivo de este estudio era analizar si la hidrólisis de las proteínas de la leche de vaca por bacterias probióticas reducía la alergenicidad de las mismas, y comparar esta hidrólisis con el proceso enzimático normalmente utilizado en la elaboración de fórmulas infantiles hipoalergénicas. Además se quiso analizar si la

presencia de probióticos tenía alguna influencia sobre el proceso de sensibilización frente a PLV.

La hidrólisis de las PLV, por los dos métodos utilizados, redujo el tamaño de las proetinas, de manera que la mayoría de los péptidos obtenidos tenían un peso molecular inferior a 1000 Da. La capacidad de sensibilización disminuyó de forma significativa como consecuencia de esta hidrólisis, y de ahí que las concentraciones plasmáticas de IgG1-PLV específica y de IgE total fueran inferiores en los dos grupos sensibilizados frente a proteínas hidrolizadas. Desgraciadamente no se pudo analizar la respuesta de los linfocitos del bazo frente a las PLV.

A pesar de que el grado de hidrólisis fue superior en la leche tratada enzimáticamente, los resultados obtenidos para los grupos VH y VF fueron muy similares. La explicación de este hecho podría estar en el efecto que ejercen los probióticos sobre el proceso de sensibilización. De hecho, en el grupo V+PRO no se observa una mayor producción de IL-4, algo que sí fue evidente cuando los ratones se sensibilizaron con leche de vaca no hidrolizada en ausencia de probióticos. Así, estas bacterias podrían equilibrar la respuesta inmunitaria, evitando el desplazamiento hacia T_H2 , y este efecto podría contribuir a la reducción de la sensibilización en los ratones que recibieron leche hidrolizada por los probióticos. No obstante la simple presencia de probióticos (grupo V+PRO), aunque facilitó una respuesta alérgica ligeramente inferior, no parece ser suficiente para reducir la alergenicidad de la leche de vaca, probablemente porque la dosis administrada no consiguió alterar la flora bacteriana de los ratones.

Por otra parte, la presencia de un mayor número de péptidos con un peso molecular superior a 6000 Da en la leche hidrolizada por bacterias podría haber inducido una cierta tolerancia de los ratones a las PLV, lo que también podría contribuir a que la reacción alérgica tras la dosis de choque fuese más leve.

10. EFECTO DE LA LECHE DE CABRA SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.

10.1. Comparación del efecto de dietas a base de leche de vaca o de cabra sobre el sistema inmunitario del ratón

En el apartado anterior (ver 9.1) se demuestra que la leche de cabra tiene una menor capacidad de sensibilización que la de vaca. Evidentemente esta menor alergenicidad está relacionada con la composición proteica, pero dada la influencia de la dieta sobre la función del sistema inmunitario (Chandra RK, 2004), nos planteamos si algún componente de la leche de cabra podía tener propiedades inmuno-reguladoras, que permitieran un mejor equilibrio de la respuesta inmunitaria.

Por ello decidimos preparar dos dietas que cumplieran los requisitos para animales de experimentación, pero cuyos componentes derivaran de las leches de vaca o de cabra.

10.1.1. Dietas y evolución del peso de los animales:

Partiendo de leche de vaca o de cabra en polvo y tras la incorporación de diferentes nutrientes, se consiguieron dietas cuyos componentes derivaban mayoritariamente de la leche de vaca o de cabra, pero cuya composición global se ajustaba a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves PG y col, 1995) para animales de experimentación (ver tablas 6-1 y 6-2).

La alimentación de ratones con estas dietas permitió un desarrollo normal de los animales, ya que la evolución del peso (figura 10-1) no fue diferente en los grupos V y CB respecto al control que consumió dieta estándar (C). Por tanto podemos asumir que las dietas cubrieron los requerimientos nutricionales de los ratones empleados en este estudio.

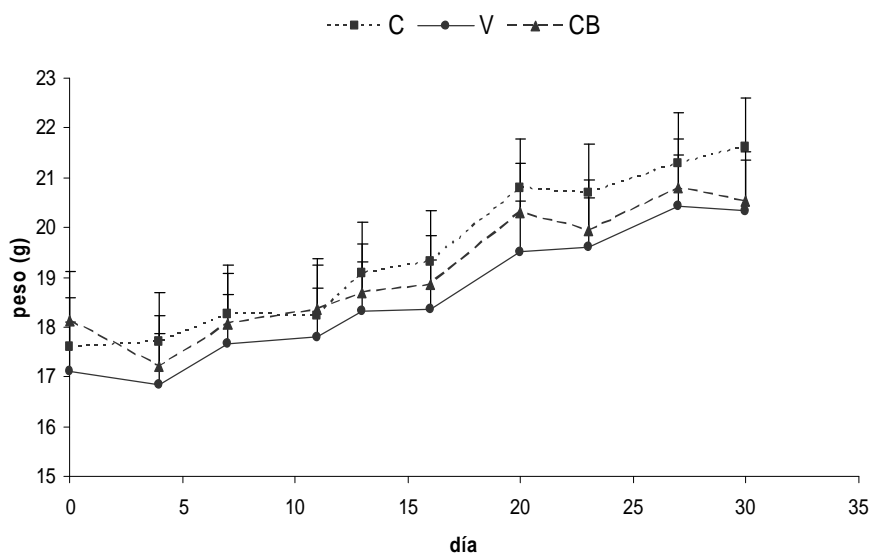


Figura 10-1. Evolución del peso de los ratones alimentados con dietas estándar (C), a base de leche de vaca (V) o de cabra (CB). Los ratones se pesaron dos veces por semana. Los valores representan la media \pm EEM (n=8).

10.1.2. Efecto de las dietas sobre la respuesta linfocitaria:

Proliferación de linfocitos

Los estímulos de la proliferación utilizados en este caso fueron mitógenos de linfocitos T (ConA) o B (LPS) ya que estos ratones no habían sido sensibilizados frente a ninguna proteína en concreto.

La presencia de estos estímulos en el medio de cultivo indujo un aumento de la proliferación tanto de linfocitos T como B en los 3 grupos estudiados (figura 10-2). No se observaron diferencias significativas en la proliferación de linfocitos B, aunque sí hubo una tendencia de los linfocitos del grupo V a proliferar más en presencia de LPS ($P=0,08$ vs C, $P=0,1$ vs CB). La proliferación de los linfocitos T en el grupo alimentado con la dieta a base de leche de vaca sí fue significativamente mayor que en el grupo CB, pero no alcanzó significación respecto al grupo control.

Estos resultados parecen apuntar a que uno o varios componentes de la leche de vaca podrían tener propiedades inmuno-estimulantes. Sin embargo, este efecto no se observa en la leche de cabra, en la que la proliferación de linfocitos

tanto T como B fue inferior y similar a la de los ratones alimentados con una dieta estándar.

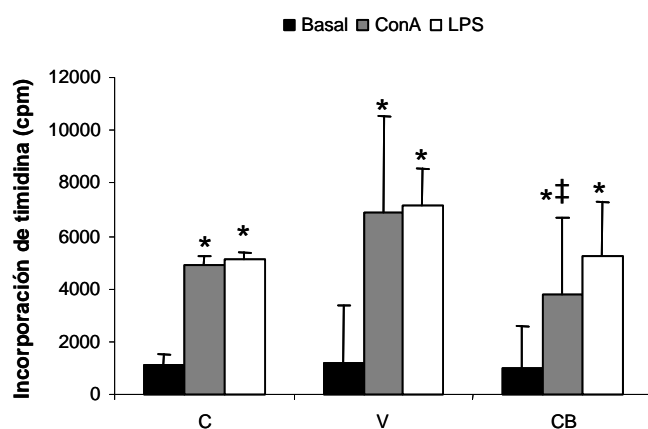


Figura 10-2. Proliferación de los linfocitos de ratones alimentados con una dieta control (C), a base de leche de vaca (V) o de cabra (CB). Los linfocitos aislados del bazo se cultivaron en ausencia (basal) o presencia de estímulos específicos de linfocitos T (Con A) ($5\mu\text{g/ml}$) o B (LPS) ($50\mu\text{g/ml}$). ^3H -timidina ($1\mu\text{Ci/ml}$) se añadió al medio y se incubó durante 48h. El grado de proliferación se determinó según la timidina incorporada. Los resultados se expresan como valor medio de incorporación de timidina (cpm) \pm EEM (n=8). * $P < 0,05$ vs basal, ‡ $P < 0,05$ vs V.

De acuerdo con estos resultados, el número de células que componen el bazo (expresado como millones de células/mg de bazo) fue ligeramente superior en el grupo V respecto a los grupos C y CB ($1,13 \pm 0,35$ vs $0,92 \pm 0,35$ en C y $0,87 \pm 0,35$ en CB), aunque no llegó a alcanzar significación estadística ($P=0,1$ vs C, $P=0,06$ vs CB).

Perfil de citoquinas producido por los linfocitos

Con objeto de comparar el efecto de los componentes de las leches de vaca y cabra sobre el perfil de citoquinas producido por los linfocitos, se midieron las concentraciones de estos compuestos en el sobrenadante de un cultivo de linfocitos T (ConA). La figura 10-3 muestra las concentraciones de IL-2 e IL-4 como representantes de las repuestas T_{H1} y T_{H2} respectivamente. La IL-2 también juega un papel clave en la proliferación de linfocitos, por lo que podría relacionarse su producción con los resultados comentados anteriormente (figura 10-2).

No hubo diferencias significativas en el perfil de citoquinas producido por los linfocitos T, aunque sí se observa una clara tendencia en los ratones alimentados con la dieta a base de leche de cabra, a una menor producción de IL-4 respecto al grupo V ($P=0,06$) lo que indica menor predisposición a desarrollar repuestas de tipo T_{H2} , que son las responsables de las alergias.

No se observaron diferencias en la respuesta T_H1 como se puede observar en la producción de IL-2, que fue similar en los grupos V y CB. Esta última citoquina tampoco parece ser responsable del ligero aumento en la proliferación de los linfocitos del grupo V.

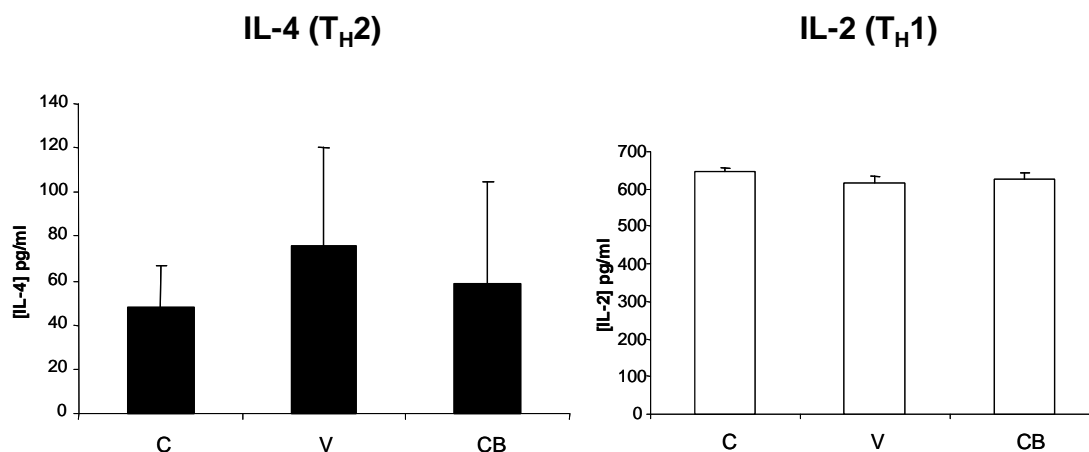


Figura 10-3. Producción de citoquinas por linfocitos T. Los linfocitos aislados a partir del bazo se cultivaron durante 48h en presencia de ConA (5 μ g/ml). Transcurrido ese tiempo se recogieron los sobrenadantes en los que se midió por un método de ELISA comercial la concentración de IL-4, IL-2. Los resultados se expresan como valor medio (pg/ml) \pm EEM (n=8).

10.1.3. Parámetros plasmáticos:

El análisis de los niveles plasmáticos de inmunoglobulinas dio como resultado una menor concentración de IgG e IgG1 en la sangre de ratones alimentados con la dieta a base de leche de cabra (figura 10-4). El resto de las inmunoglobulinas se encontraron en concentraciones similares en todos los grupos.

De los resultados obtenidos al analizar los niveles plasmáticos de citoquinas, el resultado más destacado fue la mayor concentración de IL-10 en el plasma de los ratones del grupo CB (figura 10-5). La IL-10 es una citoquina T_H3 con un importante papel inmuno-regulador. Esta citoquina inhibe tanto la respuesta T_H2 como la T_H1 y podría ser responsable de la menor concentración de inmunoglobulinas en el plasma de los ratones de este grupo.

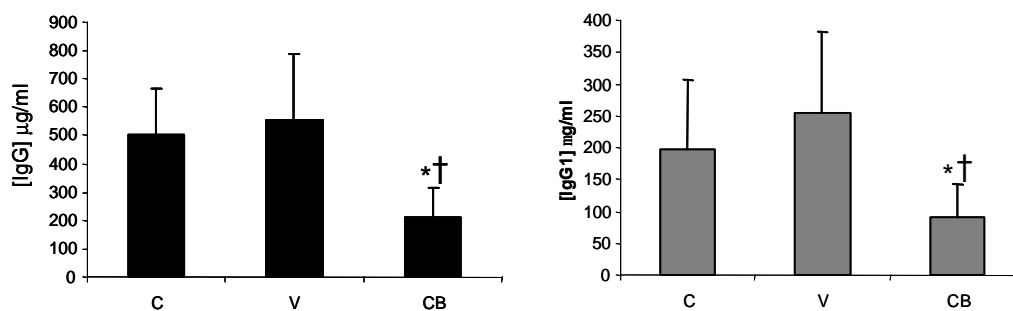


Figura 10-4. Concentración plasmática de inmunoglobulinas. Inmediatamente tras el sacrificio se extrajo sangre de los animales. A partir de ella se obtuvo el plasma en el que se determinaron, por métodos de ELISA comerciales, las concentraciones de IgG e IgG1. Los resultados se expresan como valor medio ($\mu\text{g/ml}$) \pm EEM. * $P < 0,05$ vs C; † $P < 0,05$ vs V.

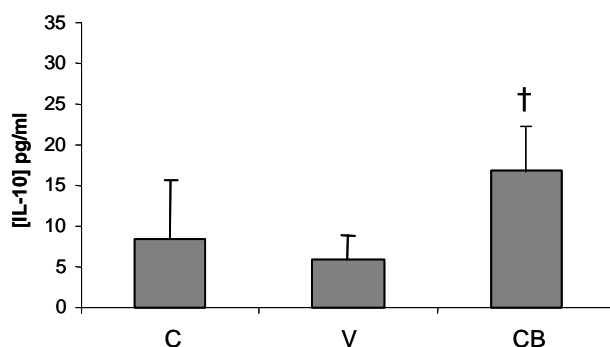


Figura 10-5. Concentración plasmática de IL-10. A partir de la sangre de los ratones se obtuvo el plasma en el que se determinaron, por métodos de ELISA comerciales, las concentraciones de IgG e IgG1. Los resultados expresan como valor medio ($\mu\text{g/ml}$) \pm EEM ($n=8$). † $P < 0,05$ vs V.

10.1.4. Efectos sobre los lactobacilos y bifidobacterias de la flora intestinal:

Las bacterias que componen la flora intestinal dependen en gran medida de la dieta. Por esta razón se recogieron heces de los ratones a distintos tiempos y se analizó el efecto de las dietas a base de leche de vaca y de cabra sobre el crecimiento lactobacilos y bifidobacterias.

A día 0 el número de lactobacilos y bifidobacterias en las heces de los ratones no mostró diferencias significativas entre los grupos analizados (tabla 10-1). Sin embargo a día 30 se observó un aumento del número de bifidobacterias en las heces de los ratones del grupo CB respecto a día 0. En los grupos C y V, al contrario de lo que ocurrió en CB, se produjo un ligero descenso en el número de bifidobacterias a día 30.

En cuanto a los lactobacilos, tras 30 días de alimentación con las diferentes dietas, el número de bacterias disminuyó en los 3 grupos y

especialmente en el grupo CB. Este descenso no es coherente con el aumento de bifidobacterias observado, porque las condiciones de crecimiento de ambos tipos de bacterias son similares. Podría ser debido a algún componente de la dieta de cabra que tuviera un efecto prebiótico selectivo de las bifidobacterias.

día 0		
	Lactobacilos	Bifidobacterias
C	10,51	10,51
V	10,15	10,28
CB	10,63	10,28
día 30		
	Lactobacilos	Bifidobacterias
C	9,60	10,19
V	9,30	9,71
CB	8,77	10,69

Tabla 10-1. Recuento de lactobacilos y bifidobacterias en las heces de los ratones. Se tomaron heces a día 0 y día 30 que se cultivaron en medios específicos. Se recogieron las heces de cada grupo de manera conjunta y por ello se representa un único valor, sin posibilidad de hacer estadística. Los resultados se expresan en log cfu/g de heces.

En las mismas muestras de heces de los ratones se determinó la concentración de IgA (ng/mg de heces). A día 0 no se observó diferencia entre los 3 grupos, pero tras 30 días de alimentación con las distintas dietas la concentración de IgA en las heces de los ratones aumentó en los grupos C y V, pero disminuyó en el grupo CB. Al tener un único valor no se pudo hacer estadística, pero parece un dato en el que habría que profundizar por la importancia de la IgA en la defensa frente a antígenos y microorganismos patógenos.

10.1.5. Resumen de los resultados:

A la vista de estos resultados no parece que ni la dieta de vaca ni la de cabra tengan un efecto marcado sobre el sistema inmunitario. Las diferencias observadas no han sido importantes, aunque cabría destacar el aumento de IL-10 provocado por la dieta a base de leche de cabra. Esta citoquina inhibe tanto la

respuesta T_H1 como T_H2 , lo que sugiere una cierta capacidad inmuno-moduladora de la leche de cabra.

En los ratones del grupo CB se observó una menor producción de IL-4 por linfocitos T, que podría ser responsable de la menor producción de IgG e IgG1. Este resultado concuerda con la menor capacidad de sensibilización de la leche de cabra comentada en el apartado anterior (ver apartado 9.1). La menor concentración de IgA en las heces de los ratones podría ser negativa en la defensa frente a infecciones, aunque este dato debe ser confirmado por otros estudios, ya que se dispone de un único valor. No obstante, esta dieta podría tener también un efecto bifidogénico, interesante en la prevención de infecciones intestinales.

En cuanto a la leche de vaca parece que tiene propiedades inmuno-estimulantes en general, por la mayor proliferación linfocitaria. Concretamente parece que estimula la respuesta de tipo T_H2 , lo que concuerda con su mayor capacidad de sensibilización. De todas formas ni este ni los demás efectos comentados son claros, son sólo tendencias que deben ser confirmadas en posteriores estudios.

11. EFECTOS FUNCIONALES DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE DE CABRA:

Una de las principales diferencias entre la leche de vaca y la de cabra es el alto contenido en oligosacáridos de esta última. Actualmente existe un creciente interés científico en estos compuestos, y los que se han aislado de la leche humana han demostrado su bioactividad. Por esta razón, decidimos obtener la fracción de oligosacáridos de la leche de cabra y analizar sus posibles efectos funcionales.

Para ello se recurrió a diferentes ensayos de actividad *in vitro* principalmente enfocados a analizar los efectos de estos compuestos en la salud gastrointestinal del recién nacido. Así mismo se analizó la posible absorción intestinal de los oligosacáridos, para plantear no sólo efectos locales sino también sistémicos. Finalmente y en función de los resultados obtenidos *in vitro* se recurrió a modelos *in vivo* de inflamación intestinal, con objeto de analizar los efectos de estos azúcares en dicho proceso inflamatorio, frecuente en niños de bajo peso al nacer.

11.1. Obtención de oligosacáridos a partir de leche de cabra

Partiendo de leche de cabra desnatada y siguiendo el proceso descrito en el apartado 7.1, se consiguieron aislar e identificar más de 20 estructuras diferentes de oligosacáridos que están resumidas en la tabla 11-1. Las características más importantes de estas estructuras son su variabilidad y su riqueza en ácido siálico, que es también característica de los oligosacáridos de la leche humana (Martínez-Férez A, 2004).

Los oligosacáridos mayoritarios son la 6-sialil-lactosa y la 3-sialil-lactosa como oligosacáridos ácidos y la galactosil-lactosa como oligosacárido neutro. Por tanto, además del ácido siálico, estos compuestos son ricos en galactosa que es otro azúcar importante en el desarrollo cerebral del recién nacido (ver apartado 1.2.2).

Abreviatura	Nombre	Concentración (g/L)
Oligosacáridos ácidos		
6-SL	6-Sialil-lactosa	0.07 – 0.08
3-SL	3-Sialil-lactosa	0.05 – 0.06
NGL	N-glicolil-neuraminil-lactosa	0.03 – 0.04
SLNH	Sialil-lacto-N-hexaosa	0.001 – 0.005
DSL	Di-sialil-lactosa	0.001 – 0.005
SNGL	Sialil-N-glicolil-neuraminil-lactosa	0.001 – 0.005
SHL	Sialil-hexosil-lactosa	Trazas
NGHL	N-glicolil-neuraminil-hexosil-lactosa	Trazas
SNGHL	Sialil-N-glicolil-neuraminil-hexosil-lactosa	Trazas
DSHL	Di-sialil-hexosil-lactosa	Trazas
DNGL	Di-N-glicolil-neuraminil-lactosa	Trazas
SDHL	Sialil-di-hexosil-lactosa	Trazas
DNGHL	Di-N-glicolil-neuraminil-hexosil-lactosa	Trazas
NGLNH	N-glicolil-neuraminil-lacto-N-hexaosa	Trazas
Oligosacáridos neutros		
GL	Galactosil-lactosa	0.05 – 0.06
NAL	N-acetil-glucosaminil-lactosa	0.03 – 0.04
LNH	Lacto-N-hexaosa	0.001 – 0.005
NALNH	N-acetil-glucosaminil-lacto-N-hexaosa	0.001 – 0.005
DNAL	Di-N-acetil-glucosaminil-lactosa	0.001 – 0.005
NAHL	N-acetil-glucosaminil-hexosil-lactosa	Trazas
NADHL	N-acetil-glucosaminil-di-hexosil-lactosa	Trazas
Total oligosacáridos		0.25 – 0.30

Tabla 11-1. Oligosacáridos mayoritarios obtenidos a partir de la leche de cabra por HPAEC-PAD, abreviatura, nombre y concentración (Martínez-Férez A, 2004).

11.2. Ensayos de actividad in vitro

11.2.1. Inhibición de la adhesión de microorganismos patógenos:

Uno de los efectos más interesantes de los oligosacáridos es su capacidad para bloquear los puntos de unión de bacterias patógenas. Así, se evitaría que dichas bacterias se unieran a los receptores de las células intestinales, requisito esencial para su patogenicidad.

Con objeto de analizar si los oligosacáridos eran capaces de inhibir la unión de microorganismos patógenos a células intestinales, se utilizaron cultivos *in vitro* de dichas células que se incubaron en presencia o ausencia de microorganismos patógenos y de dos tipos de oligosacáridos.

La capacidad de adhesión a las células HT-29 fue muy variable entre las diferentes bacterias estudiadas. *Listeria monocytogenes* subesp. *Ohio* fue la que dio un mayor porcentaje de adhesión a las células ($35,9 \pm 4,1\%$), por encima de *Escherichia coli* 89 ($10,6 \pm 3,5\%$), mientras que el porcentaje de adhesión de *Salmonella cholerasuis typhi* fue muy bajo ($2,3 \pm 0,8\%$).

La adición de oligosacáridos de leche de cabra (5mg/ml) al medio de cultivo de las células, redujo la capacidad de adhesión de *L.monocytogenes* subespecie *Ohio* y de *E.coli* 89 en un 24% y 46% respectivamente, pero no modificó la adhesión de *S.cholerasuis typhi* (figura 11-1). En este último caso el porcentaje de adhesión inicial fue muy bajo, por lo que el margen de actuación de los oligosacáridos era muy reducido. El efecto de los FOS se limitó a la inhibición de la adhesión de *L.monocytogenes* subesp. *Ohio*.

Estos resultados sugieren que los oligosacáridos de leche de cabra, probablemente por su estructura similar a la de los puntos de anclaje de bacterias patógenas a células intestinales, actúan como receptores de patógenos impidiendo la adhesión de éstos a células intestinales y con ello su capacidad de infección. La no inhiición de la adhesión de *S.typhi* podría deberse a la existencia de algún mecanismo de adhesión diferente que no fuera bloqueado por los oligosacáridos.

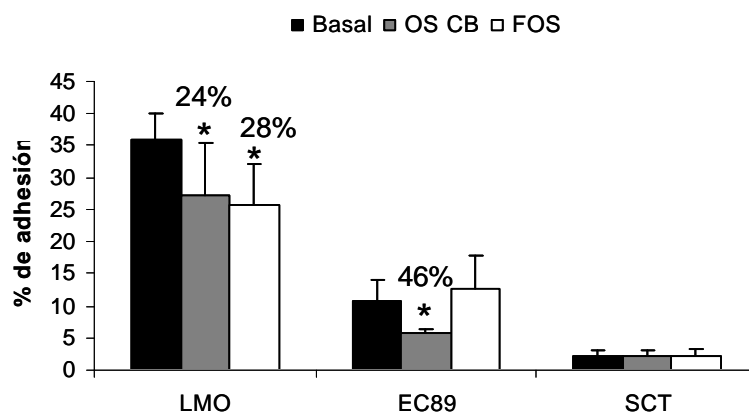


Figura 11-1. Adhesión de microorganismos patógenos a células HT-29. Las bacterias se marcaron con [³H]-timidina (1μCi/ml) y se incubaron durante 90 minutos con células HT-29 en ausencia (basal) o presencia de oligosacáridos de leche de cabra (OS CB) (5mg/ml). O fructooligosacáridos (FOS) (5mg/ml). LMO: *Listeria monocytogenes* subsp. *Ohio*. EC89: *Escherichia coli* 89. SCT: *Salmonella cholersuis typhi*. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes por triplicado ± SEM. Los números encima de las barras representan el porcentaje de inhibición de la adhesión. *:P<0,05 vs basal. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA de una vía y los test *a posteriori*.

11.2.2. Capacidad prebiótica de los oligosacáridos de leche de cabra:

El efecto prebiótico de un azúcar se basa en su capacidad para favorecer el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas que constituyen la flora intestinal. Para comprobar si los oligosacáridos de leche de cabra tenían efecto prebiótico se incubaron diferentes bacterias patógenas y probióticas en medios que contenían estos azúcares como única fuente de carbono.

La figura 11-2 muestra que sólo la bifidobacteria utilizada fue capaz de fermentar los oligosacáridos de leche de cabra y cambiar el pH del medio, y por tanto la densidad óptica (D.O.), de forma significativa respecto al basal. Los lactobacilos produjeron un ligero cambio de pH pero no llegó a alcanzar significación estadística. Sin embargo, los FOS sí fueron fermentados tanto por lactobacilos como por bifidobacterias, como se ve por el cambio en la D.O. del medio de cultivo. Ninguno de los oligosacáridos analizados fue fermentado por las bacterias patógenas.

A la vista de estos resultados los oligosacáridos en general parecen tener una clara actividad prebiótica, sobre todo los FOS que son fermentados por varios tipos de bacterias ácido-lácticas y bifidobacterias. Los oligosacáridos de leche de

cabra son fermentados de forma exclusiva por las bifidobacterias, lo que quiere decir que favorecerían el crecimiento selectivo de este tipo de microorganismos, que son los principales constituyentes de la flora intestinal de los niños amamantados (ver apartado 1.2.7).

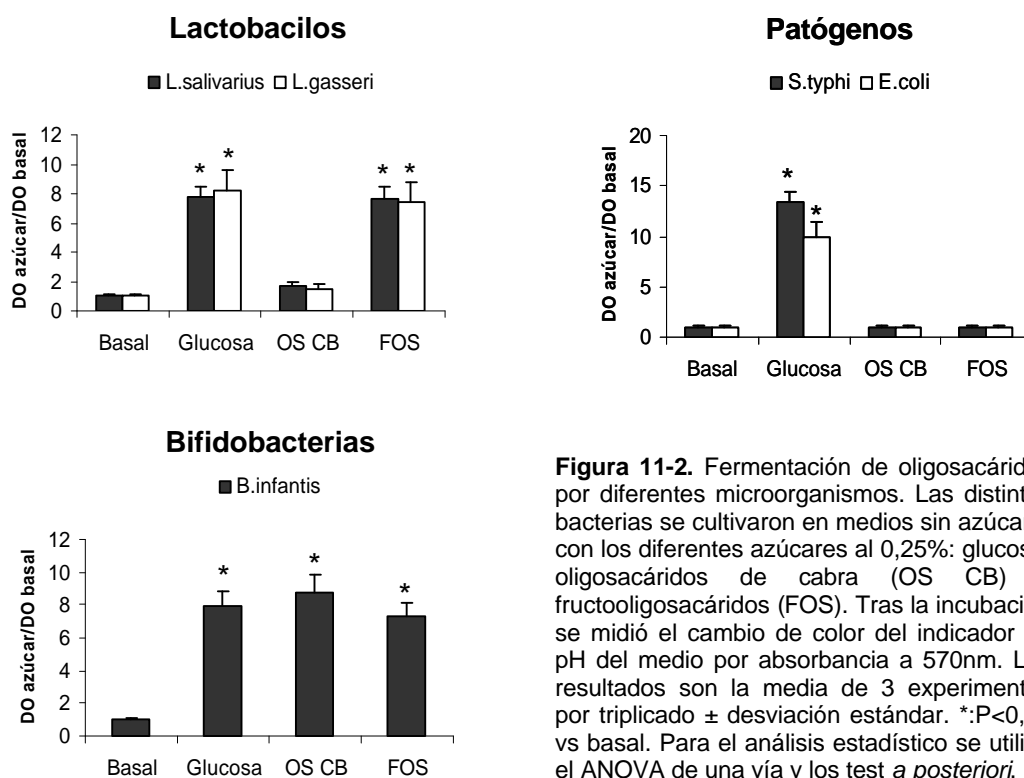


Figura 11-2. Fermentación de oligosacáridos por diferentes microorganismos. Las distintas bacterias se cultivaron en medios sin azúcar o con los diferentes azúcares al 0,25%: glucosa, oligosacáridos de cabra (OS CB) o fructooligosacáridos (FOS). Tras la incubación se midió el cambio de color del indicador de pH del medio por absorbancia a 570nm. Los resultados son la media de 3 experimentos por triplicado \pm desviación estándar. *:P<0,05 vs basal. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA de una vía y los test *a posteriori*.

11.2.3. Ensayo de transporte:

Integridad de la monocapa celular a lo largo del estudio

Para determinar la integridad de la monocapa de células Caco-2 antes y después del transporte se utilizaron 2 métodos:

- Medida de la resistencia transepitelial (RTE), que en todos los pocillos utilizados se mantuvo por encima de los 1000 ohm/cm².
- Permeabilidad a una solución de azul de tripán al 0,005%: en ningún caso se detectó colorante en la zona basolateral por medida de la DO a 595nm.

De estos resultados se concluye el estado adecuado de la monocapa de células Caco-2 antes del transporte, y que después de éste permaneció inalterada.

	0 min	90 min
RET (ohm/cm ²)	1130 ± 141	995 ± 100
D.O. 595 nm apical	1,08 ± 0,22	0,96 ± 0,18
D.O. 595 nm basolateral	0,035 ± 0,008	0,027 ± 0,01

Tabla 11-2. Estado de la monocapa de células Caco-2 antes (0 min) y después (90 min) del ensayo de transporte. Los valores representan la media de todos los pocillos utilizados ± EEM (n=10).

Transporte de oligosacáridos a través de la monocapa de células Caco-2

Una solución de oligosacáridos a 5mg/ml se añadió en la zona apical de varios pocillos, y se guardó una alícuota para su posterior análisis. Como control positivo, en la zona apical de otros pocillos se añadió una solución de α -metilaminoglucósido a 1mg/ml, compuesto que atraviesa la monocapa. Transcurridos los 90 minutos de incubación se recogió el volumen de la zona basolateral que se concentró por evaporación a vacío. La solución inicial y la recogida tras el transporte se analizaron por HPAEC-PAD.

La figura 11-3 muestra los cromatogramas obtenidos entre los 12 y los 23 minutos de tiempo de retención, que son los tiempos a los que eluyen los oligosacáridos. Se observa cómo tras el transporte en la zona basolateral aparecen varios picos que coinciden con otros observados en la solución inicial. Estos picos corresponden a oligosacáridos que estaban en la solución inicial y que han atravesado la monocapa de células intestinales. Por comparación con el tiempo de retención de determinados patrones de oligosacáridos, se consiguió identificar el pico que aparece a los 13,5 minutos como ácido siálico, y el que aparece a los 18,6 minutos como 3-sialil-lactosa, uno de los oligosacáridos mayoritarios de la mezcla obtenida a partir de la leche de cabra (ver tabla 11-1). Los otros dos picos restantes no fueron identificados porque no se disponía de los patrones adecuados.

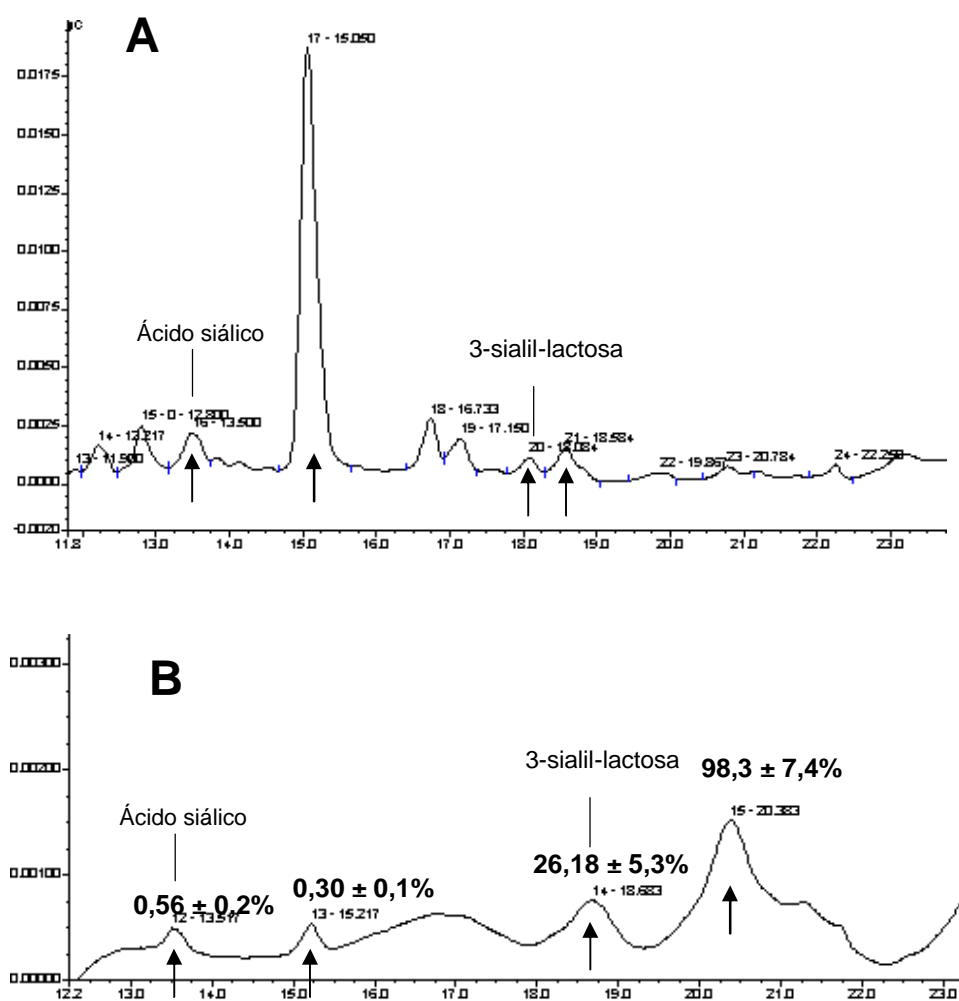


Figura 11-3. Transporte de oligosacáridos a través de una monocapa de células intestinales. Una solución inicial de oligosacáridos a 5mg/ml (A) se añadió en la zona apical. Tras 90 minutos de incubación a 37°C se recogió el volumen de la zona basolateral (B) que se concentró por evaporación a vacío. Ambas fracciones fueron analizadas por HPAEC-PAD. Los valores que aparecen encima de los picos representan el porcentaje de compuesto que atravesó la monocapa \pm desviación estándar.

En cuanto al porcentaje de absorción, cabe destacar que el control positivo, que sabemos que atraviesa la monocapa, dio un porcentaje de absorción del $6,7 \pm 1,2\%$. El porcentaje de cada uno de los oligosacáridos que atravesaron la monocapa aparece en la figura 11-3, destacando que el pico identificado como 3-sialil-lactosa, uno de los compuestos mayoritarios, dio un porcentaje de absorción de $26,18 \pm 5,3\%$. Uno de los picos no identificados dio un porcentaje de absorción próximo al 100%, es decir que prácticamente la totalidad del compuesto atravesó la monocapa de células intestinales. Sin embargo este compuesto estaba presente en la solución inicial a una concentración baja.

Estos resultados sugieren que algunos de los oligosacáridos de la leche de cabra se absorben a nivel intestinal y, por tanto, podrían ejercer efectos sistémicos. Sin embargo las cantidades de estos compuestos que llegan a sangre son muy pequeñas y sería interesante comprobar si dichas cantidades son suficientes para los efectos funcionales que han demostrado tener los oligosacáridos.

11.2.4. Resumen de los resultados de los estudios *in vitro*:

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* realizados, sugieren que los oligosacáridos en general, y los de leche de cabra en particular, tienen un importante efecto antiinfeccioso a nivel intestinal. Por ello estos compuestos podrían suponer una importante ayuda en la defensa frente a infecciones gastrointestinales, que son muy frecuentes en recién nacidos, sobre todo en aquellos alimentados con fórmulas infantiles, que carecen de los componentes protectores de la leche humana, entre ellos los oligosacáridos.

Por un lado estos azúcares inhiben la adhesión de microorganismos patógenos al epitelio intestinal, lo que impide la invasión y favorece su eliminación en las heces. Además tienen un efecto prebiótico, ya que favorecen el crecimiento de las bifidobacterias en la competencia que se da entre estas y las bacterias patógenas durante el establecimiento de la flora intestinal. Ambos efectos facilitan que el recién nacido tenga una flora intestinal más favorable para la prevención de infecciones gastrointestinales.

Los efectos comentados se ejercen a nivel local, sin la necesidad de que los oligosacáridos sean absorbidos. Sin embargo, el ensayo de transporte a través de la monocapa de células intestinales, refleja que un pequeño porcentaje de estos compuestos son capaces de atravesar el epitelio intestinal, lo que abre nuevas vías de investigación sobre los posibles efectos de estos compuestos en otros tejidos.

11.3. Efecto de los oligosacáridos en modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD):

Una vez comprobados *in vitro* los posibles efectos beneficiosos a nivel intestinal de los oligosacáridos, nos planteamos si estos efectos se verían

reflejados *in vivo* y en una patología concreta. Se eligió la inflamación intestinal por su implicación en la ECN, patología con una elevada incidencia en niños prematuros y de bajo peso al nacer que se ha relacionado con el consumo de fórmulas infantiles.

El efecto inhibitorio sobre la acción de bacterias patógenas, implicadas en esta patología, hacía pensar en un papel beneficioso de los oligosacáridos. En primer lugar, decidimos estudiar los efectos de oligosacáridos comerciales (FOS) en un modelo animal de IBD y en función de los resultados obtenidos nos planteamos evaluar el efecto de los oligosacáridos de la leche de cabra en dicha patología.

11.3.1. Efecto de los FOS en un modelo de inflamación intestinal por ácido trinitro-benceno-sulfónico (TNBS):

Para comprobar el efecto de los FOS en la inflamación intestinal se prepararon dos dietas con una composición idéntica excepto en la fuente de fibra, que en una de las dietas fue celulosa (control y control-TNBS) al 5% del total de la dieta, y en la otra fueron FOS también al 5%. Tras un periodo de alimentación con estas dietas algunos de los animales fueron sacrificados para comprobar el efecto prebiótico de los FOS en ratas sanas.

Al resto de los animales se les indujo la inflamación intestinal por administración de un enema de TNBS disuelto en etanol. Una semana más tarde los animales se sacrificaron y se analizaron diferentes parámetros relacionados con la enfermedad.

Efecto prebiótico de los FOS en ratas sanas

Los resultados obtenidos *in vitro* apuntaban a un posible papel prebiótico de los FOS, favoreciendo el crecimiento de bacterias probióticas. Para comprobar si este efecto se confirmaba *in vivo* se sacrificaron 10 animales de cada grupo tras 15 días de alimentación con las dietas ricas en diferentes fibras.

En estos animales se analizaron las características del contenido intestinal, y conforme a lo esperado los resultados confirmaron el papel prebiótico de los FOS. Como se muestra en la figura 11-4, la producción de los 3 AGCC estudiados (acético, propiónico y butírico) fue significativamente superior en los

animales que consumieron FOS. Probablemente como consecuencia de esto el pH del contenido colónico fue inferior en el grupo FOS respecto al control ($5,57 \pm 0,58$ vs $6,26 \pm 0,23$, $P < 0,05$).

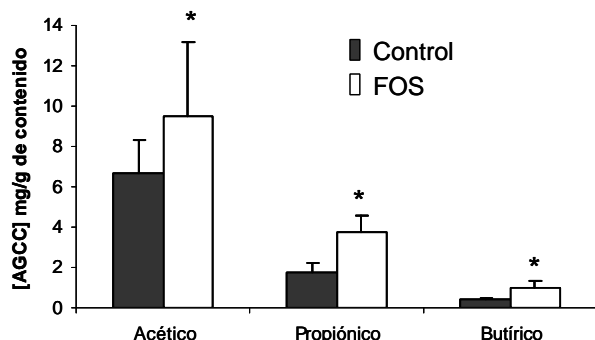


Figura 11-4. Concentración de AGCC en el contenido colónico de ratas alimentadas con dieta rica en celulosa (control) o en fructooligosacáridos(FOS). Inmediatamente tras el sacrificio de los animales se tomó una muestra de su contenido colónico y se analizó la concentración de los ácidos acético, propiónico y butírico. Los valores representan la media (mg/g de contenido) \pm EEM (n=10). * $P < 0,05$ vs control.

El análisis de la flora bacteriana de ambos grupos de animales dio como resultado un mayor contenido de lactobacilos y bifidobacterias en el grupo FOS, aunque sólo en el último caso se alcanzó diferencia significativa (tabla 11-3). Por el contrario, la presencia de bacterias coliformes, potencialmente patógenas, fue significativamente menor en el grupo FOS respecto al control. El contenido en enterobacterias no mostró diferencias significativas, aunque su contenido fue ligeramente superior en el grupo FOS. Estos resultados sugieren que los FOS favorecen el crecimiento de bacterias beneficiosas en detrimento de las potencialmente patógenas. En este efecto debe jugar un papel importante la disminución del pH provocada por la mayor producción de AGCC, ya que en estas condiciones de pH son más favorables para el crecimiento de bacterias probióticas.

	Lactobacilos	Bífidobacterias	Enterobacterias	Coliformes
Control	$7,69 \pm 1,35$	$7,99 \pm 1,36$	$6,28 \pm 1,25$	$8,22 \pm 2,56$
FOS	$8,13 \pm 2,01$	$8,43 \pm 2,21$ *	$6,78 \pm 2,32$	$6,74 \pm 1,65$ *

Tabla 11-3. Cuantificación de la flora bacteriana presente en el contenido intestinal de ratas alimentadas con dietas ricas en celulosa (control) o fructooligosacáridos (FOS). Los valores representan la media (log cfu/g) \pm EEM (n=10).

Una vez comprobado el efecto prebiótico de los FOS, pasamos a evaluar su papel en la inflamación intestinal.

Evaluación del estado de los animales tras la administración de TNBS

A partir del primer día tras la administración de TNBS las ratas de los grupos C-TNBS y FOS comenzaron a sufrir diarrea. Sin embargo el porcentaje de animales que la sufrieron fue siempre inferior en el grupo alimentado con FOS, sobre todo a partir del segundo día post-tratamiento (80% en C-TNBS vs 50% en FOS). Al final del estudio el porcentaje de animales con diarrea fue sólo del 10% en el grupo FOS frente al 40% en el grupo alimentado con celulosa. Aquellos animales que no recibieron TNBS (C-sanos) no manifestaron diarrea en ningún momento del estudio.

De acuerdo con estos resultados, la pérdida de peso en las ratas alimentadas con FOS fue significativamente inferior desde el día 5 post-tratamiento (día 17) y hasta el final del estudio (figura 11-5).

La pérdida de peso pudo deberse tanto a la diarrea como al menor consumo de dieta de los animales enfermos. Durante las dos semanas en las que todos los animales estuvieron sanos el consumo de dieta medio por día fue el mismo en ratas alimentadas con celulosa y con FOS (9 g/día en Control vs 8,7 g/día en FOS). Sin embargo, a partir del día 1 post-tratamiento y hasta el final del estudio, las ratas que recibieron TNBS redujeron su consumo de dieta (8,5 g/día en C vs 5,2 g/día y 6,6 g/día en C-TNBS y FOS).

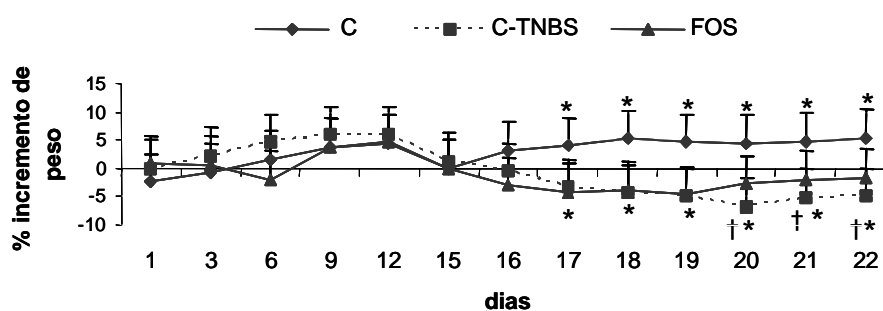


Figura 11-5. Incremento de peso de las ratas sanas (C), enfermas control (C-TNBS) y enfermas alimentadas con fructooligosacáridos (FOS). Los valores representan la media \pm EEM (n=10). *P<0,05 vs C-sano. † P<0,05 vs C-TNBS.

Análisis del daño a nivel del colon

Inmediatamente tras el sacrificio se extrajo el colon de todas las ratas y se analizó el daño macroscópico siguiendo el criterio descrito anteriormente (ver apartado 7.3.1). Las ratas tratadas con TNBS sufrieron una inflamación de colon, como se comprueba por la mayor relación peso/longitud (tabla 11-4). Sin embargo, las ratas que consumieron FOS presentaron una menor inflamación, aunque esta diferencia no llegó a alcanzar significación estadística (P=0,07).

De la misma forma el TNBS causó un daño a nivel de colon que se clasificó en función de su longitud y de un sistema de puntuación (Camuesco D y col, 2005). De nuevo las ratas del grupo FOS presentaron un daño que en este caso sí fue significativamente menor, tanto en longitud como en puntuación, que el de los animales del grupo control.

	Peso(mg)/longitud(cm)	daño macroscópico	
		longitud daño (cm)	puntuación
Control	70,32 ± 6,22	0	0
C-TNBS	243,08 ± 42,22*	3,53 ± 0,44	7,0 ± 1,2
FOS	168,16 ± 17,79*‡	2,65 ± 0,24†	5,5 ± 1,1†

Tabla 11-4. Evaluación de la inflamación y del daño macroscópico a nivel del colon. Inmediatamente tras el sacrificio se extrajo el colon de cada animal que se analizó en función de criterios previamente publicados. Los valores representan la media ± EEM (n=10). *:P<0,05 vs Control, †: P<0,05 vs C-TNBS, ‡: P=0,07 vs C-TNBS.

Por otra parte, se realizaron cortes histológicos del tejido y se tiñeron con hematoxilina y eosina para analizar la presencia de ulceraciones e infiltrados inflamatorios. En función de su estado se asignó a cada muestra una puntuación según criterios descritos anteriormente (ver apartado 7.3.1).

Las muestras obtenidas de ratas alimentadas con celulosa como única fuente de fibra presentaron ulceración de la mucosa entre severa y moderada en todos los animales analizados, con infiltrados inflamatorios muy severos. En algunos animales (5 de 10) la lesión afectó también a la submucosa, al epitelio y a la capa muscular en las que se observaron infiltrados inflamatorios entre leves y moderados formados por polimorfonucleares y macrófagos. La puntuación media de las lesiones en este grupo fue de 20,3 ± 4,8 y en 5 animales se observó peritonitis moderada o severa.

En los animales alimentados con FOS las lesiones fueron significativamente más leves ($11,5 \pm 0,9$, $P < 0,05$). Sólo 6 de los 10 animales analizados presentaron ulceración moderada o severa de la mucosa y de la lámina propia, con infiltrados severos. El resto no presentó ninguna lesión. En estos 6 animales el infiltrado de la capa submucosa fue leve, aunque se observaron lesiones en la capa muscular.

Parámetros bioquímicos

Como consecuencia de la inflamación provocada por la administración del TNBS, se produjo un aumento de la actividad MPO a nivel del colon de ratas enfermas (Figura 11-6A). Este aumento de la MPO se podría deber a la infiltración de neutrófilos característica del proceso inflamatorio. Como ya se vio en el análisis histológico, las lesiones provocadas por la inflamación se caracterizan por infiltrados celulares, y el aumento de la actividad MPO es consecuencia de éstos.

No se observaron diferencias significativas entre los animales enfermos alimentados con celulosa y los que recibieron FOS, a pesar de que histológicamente las lesiones en estos últimos fueron más leves.

También debido al proceso inflamatorio se produjo un descenso en los niveles de glutatión a nivel del colon (figura 11-6B), probablemente como consecuencia del estrés oxidativo generado por la producción de radicales libres de oxígeno. De hecho el aumento de la actividad MPO es una prueba de la mayor producción de estos compuestos en las ratas enfermas. Tampoco en este caso se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de ratas enfermas, al menos en lo que a la concentración total de glutatión se refiere, ya que este método no permitió diferenciar entre la forma oxidada y la reducida de este compuesto.

Concentración de AGCC en el contenido colónico

Los AGCC (acético, propiónico y butírico) son producidos por las bacterias que constituyen la flora intestinal a partir de carbohidratos no digeribles. Su efecto es beneficioso por la disminución del pH que provocan, que origina unas condiciones desfavorables para el crecimiento de bacterias patógenas.

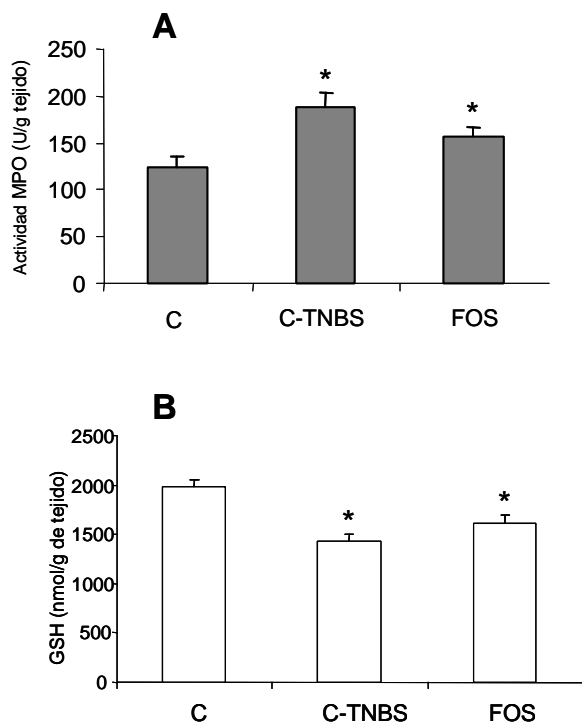


Figura 11-6. Actividad MPO (UI/g de tejido) (A) y niveles de glutatión (nmol/g de tejido) (B) en el colon de ratas sanas (C) y enfermas (C-TNBS y FOS). Tras el sacrificio de las ratas se extrajo el colon que se dividió en tiras longitudinales y se utilizó para la determinación de MPO y glutatión por métodos anteriormente descritos (ver 7.3.1). Los valores representan la media (n=10) \pm EEM. *: $P < 0,05$.

Tras el tratamiento con TNBS, la producción total de AGCC disminuyó de forma significativa en las ratas enfermas (figura 11-7). En el grupo alimentado con FOS la producción fue algo superior, aunque no alcanzó significación estadística ($P=0,08$) ni respecto al C-TNBS ni respecto a las ratas sanas.

El análisis de cada ácido graso por separado mostró que los ácidos propiónico y butírico disminuyeron de forma significativa en las ratas enfermas alimentadas con celulosa respecto al control sano. El tratamiento con TNBS disminuyó de forma significativa la producción de este ácido graso en las rats C-TNBS. Sin embargo los FOS aumentaron la producción de butirato hasta valores muy similares a los del grupo control.

De los 3 AGCC el butírico es el que tiene un mayor interés, puesto que sirve como fuente de energía para los enterocitos, favoreciendo la regeneración del epitelio intestinal (Mortensen PB y col, 1996). En el grupo FOS la concentración de este ácido graso fue significativamente superior respecto a las ratas enfermas que consumieron celulosa.

De acuerdo con estos resultados el pH del contenido colónico fue significativamente más alto en el grupo C-TNBS respecto a C y FOS ($6,8 \pm 0,5$ para C-TNBS vs $5,8 \pm 0,5$ y $6,2 \pm 0,5$ para C y FOS).

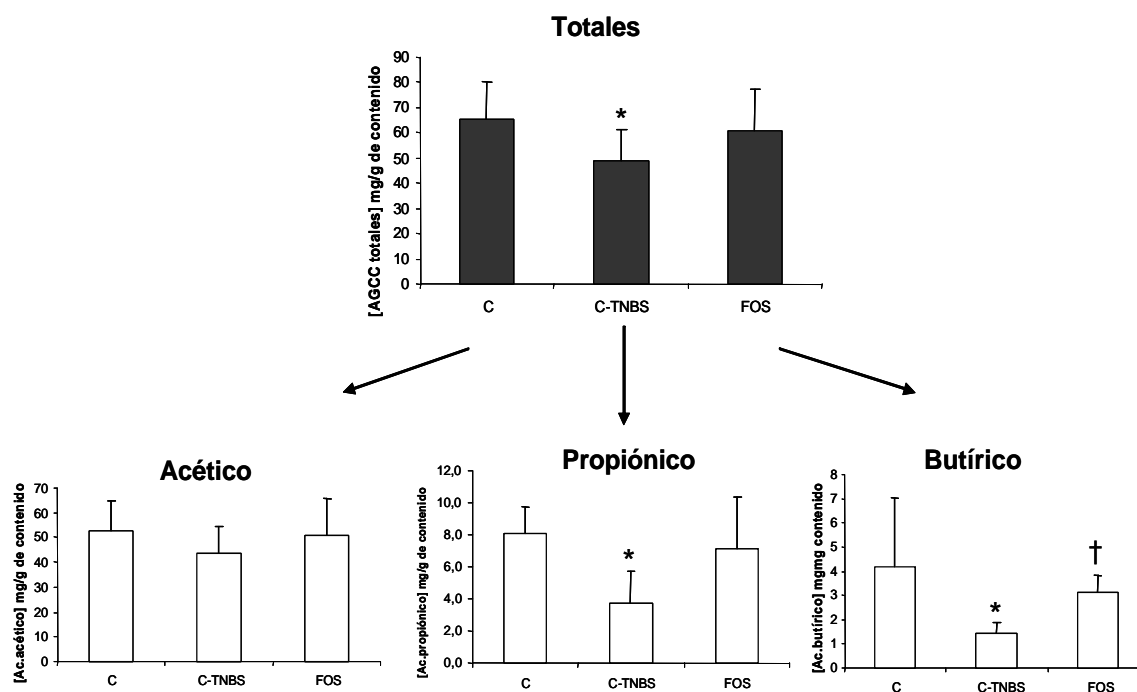


Figura 11-7. Concentración de AGCC en el contenido colónico de ratas sanas (C) y enfermas alimentadas con celulosa (C-TNBS) y fructooligosacáridos (FOS). Tras el sacrificio se extrajo el contenido colónico de las diferentes ratas que se homogenizó y se utilizó para determinar la concentración de AGCC. Los valores representan la media (mg/g de contenido) \pm EEM (n=8). *:P<0,05 vs C, †:P<0,05 vs C-TNBS.

Análisis de la flora bacteriana

Se estudiaron las poblaciones bacterianas en el contenido colónico: lactobacilos, bifidobacterias, coliformes y enterobacterias (figura 11-8). Con objeto de simplificar los resultados obtenidos, estas bacterias se englobaron en dos grupos: bacterias con un papel beneficioso (lactobacilos y bifidobacterias) y bacterias potencialmente patógenas (coliformes y enterobacterias).

En el grupo alimentado con FOS el tratamiento con TNBS no modificó de forma significativa la relación bacterias beneficiosas/patógenos, que fue similar a la del grupo control-sano. Sin embargo, en los animales enfermos alimentados con celulosa el número de bacterias potencialmente patógenas aumentó de forma significativa respecto al control, de ahí que la relación probióticos/patógenos disminuyera. A pesar de ello, no se alcanzó diferencia significativa entre los dos grupos de ratas enfermas (C-TNBS y FOS, $P < 0,1$), probablemente debido a la gran variabilidad entre los animales del mismo grupo.

	Bacterias beneficiosas (log cfu/mg)	Patógenos (log cfu/mg)	Beneficiosas/patógenas
Control-sano	5,66 ± 1,2	4,93 ± 2,0	5,31±1,80
Control-TNBS	5,14 ± 0,98	5,11 ± 0,21*	1,08±1,0*
FOS	5,55 ± 0,93	4,93 ± 0,54	4,20±3,1

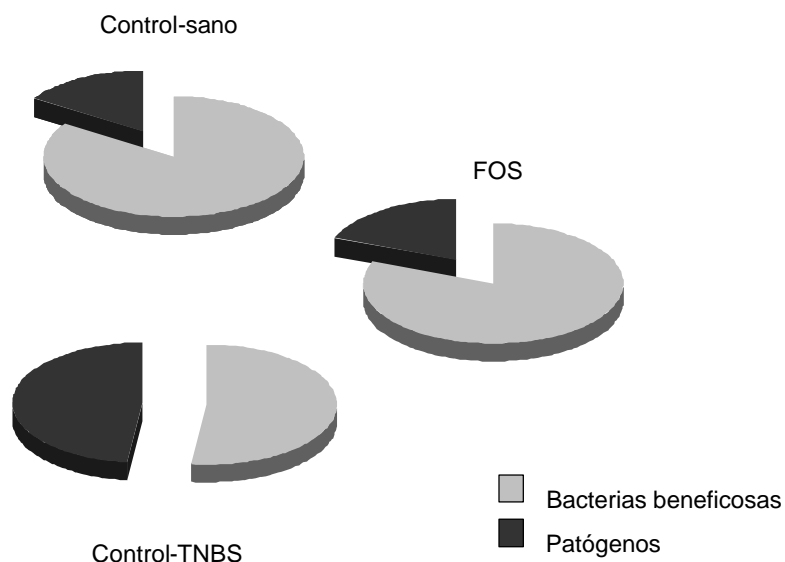


Figura 11-8. Análisis de la flora bacteriana de las ratas sanas (Control-sano) y enfermas (C-TNBS y FOS). Inmediatamente tras el sacrificio se tomó una muestra del contenido colónico de las ratas, se resuspendió en agua de peptona y se cultivó en medios específicos para hacer recuento de bacterias probióticas (lactobacilos y bifidobacterias) y potencialmente patógenas (coliformes, aerobios y enterobacterias). Los valores de la tabla representan el valor medio (log cfu/mg) ± EEM (n=8). *:P<0,05 vs Control-sano.

Resumen de los resultados

Tras 2 semanas de alimentación con las dietas ricas en celulosa o en FOS ya se observó que estos últimos inducían unas condiciones intestinales más favorables que la celulosa, ya que los FOS indujeron el crecimiento de bacterias beneficiosas y aumentaron la producción de AGCC, disminuyendo el pH a nivel del colon, donde se produce la lesión provocada por el TNBS. Estos resultados ya sugerían un papel preventivo de los FOS, fibra soluble, en comparación con una fuente de fibra insoluble como la celulosa.

Una vez inducida la inflamación intestinal por administración de TNBS, se observó que los animales alimentados con FOS perdieron menos peso y sufrieron menos diarrea que los del grupo control.

Tras el sacrificio se observó que los animales alimentados con FOS sufrieron un daño intestinal más leve tanto a nivel macroscópico como microscópico. El infiltrado inflamatorio de las ratas de este grupo, así como la ulceración, fueron más leves y como consecuencia la longitud del daño fue menor. No obstante, las lesiones a nivel del colon siguieron siendo evidentes, y también se manifestaron signos de inflamación como la actividad MPO incrementada y el menor contenido de glutatión.

La flora intestinal más favorable promovida por los FOS, puede ser una de las causas de la mejoría observada en estos animales. También la mayor producción de ácido butírico, que es una fuente de energía para los enterocitos favoreciendo la regeneración del epitelio intestinal, podría jugar un papel importante.

A pesar de que los resultados obtenidos son prometedores, el consumo del 100% de la fibra de la dieta a partir de una fuente soluble o insoluble no es real, ya que normalmente la dieta infantil y la adulta suelen contener mezclas de ambos tipos de fibra.

Finalmente, a la vista de estos resultados parece interesante comprobar los efectos de los oligosacáridos no sólo en la prevención sino también en la recuperación del daño intestinal provocado por el proceso inflamatorio.

11.3.2. Efecto de una dieta rica en oligosacáridos de leche de cabra en ratas con colitis inducida por sulfato de dextrano (DSS):

Una vez comprobado que los oligosacáridos pueden ejercer un efecto beneficioso en la inflamación intestinal, nos planteamos probar si los oligosacáridos obtenidos a partir de la leche de cabra por el procedimiento anteriormente descrito (ver apartado 7.1), tenían también efectos positivos en esta patología.

En este caso, en lugar de una dieta con un 100% de la fibra en forma de oligosacáridos, se utilizó una mezcla de estos compuestos con una fibra insoluble como la celulosa. Además se cambió el modelo animal y se empleó la

administración de DSS para originar la inflamación intestinal en las ratas. Este modelo ha sido descrito como el más adecuado para la evaluación de los factores ambientales, entre ellos la dieta, en la inflamación intestinal, ya que ni la predisposición genética ni la inmunidad específica tienen influencia en la patología causada por el DSS (Charles O Elson y col, 1995).

También se ha comprobado que en las ratas con colitis causada por DSS la concentración luminal de bacterias potencialmente patógenas está aumentada (Okayasu y col, 1990) por lo que los oligosacáridos, que como ya se ha visto tienen cierta actividad antiinfecciosa, podrían ejercer un efecto beneficioso.

Con el objetivo de probar los efectos preventivos y, sobre todo, curativos se modificaron los modelos animales de IBD por DSS previamente descritos (Mercier S y col, 2002) y se utilizó un modelo consistente en una fase inflamatoria aguda seguida de un periodo de recuperación (ver apartado 7.3.2).

Peso de los animales y consumo de dieta

. Una semana antes del comienzo del tratamiento con DSS, los animales fueron alimentados con las diferentes dietas. Durante este periodo la ganancia de peso y el consumo de dieta fueron similares en los animales alimentados con la dieta rica en celulosa y los que recibieron la mezcla de celulosa y oligosacáridos de leche de cabra.

En el grupo DSS-control el consumo de dieta descendió de forma significativa durante los 8 días de tratamiento y los siguientes 5 días de recuperación (figura 11-9A). Por el contrario, en el grupo DSS-OS la ingesta sólo descendió durante los 2 primeros días de tratamiento, pero alcanzó los valores iniciales en el día 4. Por tanto, desde el día 3 hasta el día 11 la ingesta de dieta fue significativamente superior en las ratas que recibieron oligosacáridos de leche de cabra. Para descartar los efectos debidos esta disminución en la ingesta provocada por el DSS, se introdujeron dos grupos de ratas no tratadas con DSS (*pair fed*, PF) que se alimentaron con la misma cantidad de dieta consumida por las ratas de los grupos DSS-control (PF-control) y DSS-OS (PF-OS)

Con este descenso en la ingesta de dieta en las ratas del grupo DSS-control y en consecuencia en su grupo PF, los efectos causados por la anorexia debe considerarse como otros efectos debidos al tratamiento con DSS.

Inmediatamente después del comienzo del tratamiento con DSS (día 0) las ratas del grupo control comenzaron a perder peso y lo hicieron hasta 11 días después (figura 11-9B). A partir el quinto día tras el comienzo del DSS y hasta el final del estudio, la pérdida de peso fue mayor en las ratas del grupo DSS-control en comparación con el control PF. Al final del estudio la pérdida de peso en el grupo DSS-control fue del 21% del peso inicial. De esta pérdida sólo el 11% se debe al descenso en la ingesta de dieta, pero el 10% restante es un efecto debido al tratamiento con DSS.

Los animales del grupo DSS-OS sólo perdieron peso durante los 2 primeros días del tratamiento con DSS, pero después comenzaron a ganar peso hasta el final del estudio. No hubo diferencias significativas en el peso de estos animales respecto a su control PF, lo cual quiere decir que en el grupo alimentado con oligosacáridos no se observó un efecto del DSS en el peso de los animales.

Peso de los tejidos y síntomas clínicos

La anorexia que sufrieron las ratas de los grupos control causó una importante reducción en el peso de determinados tejidos (tabla 11-5). Así, el músculo *gastrocnemius*, el timo, íleon, ciego y colon mostraron un descenso significativo en el grupo PF-control comparado con el PF-OS, en el que los pesos de los tejidos fueron similares a los de una rata sana alimentada *ad libitum*.

Aparte del efecto debido a la anorexia, el tratamiento con DSS también provocó un descenso significativo en los tejidos de las ratas control, concretamente el peso del músculo *gastrocnemius* y del timo fue significativamente inferior en las ratas tratadas con DSS. Sin embargo, esta pérdida fue significativamente menor en las ratas que se alimentaron con oligosacáridos de leche de cabra. También la relación peso/longitud del colon, que se vio aumentada en la inflamación, fue menor en estas ratas, lo que sugiere una respuesta inflamatoria más leve en el grupo DSS-OS.

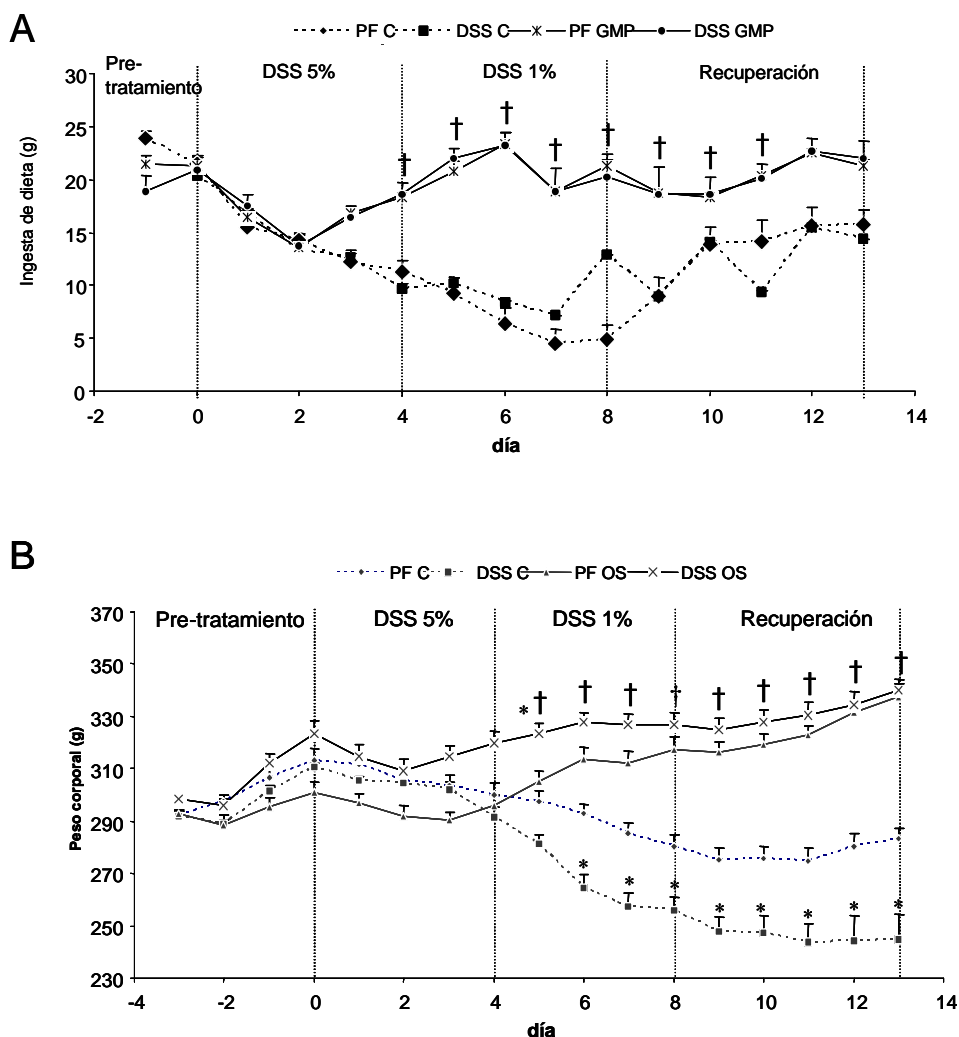


Figura 11-9. Peso corporal e ingesta de dieta. La ingesta de dieta (A) y el peso de los animales (B) se midieron diariamente. Desde el día 0 hasta el día 8 los animales recibieron DSS, al 5% durante los 4 primeros días y al 1% hasta el día 8. Los valores representan la media \pm EEM (n=10). * P<0,05 vs controles PF, † P<0.05 vs DSS-control.

La presencia de diarrea y/o sangre en las heces fue evaluada mediante un sistema de puntuación (figura 11-10). Estos síntomas fueron evidentes a partir del tercer día post-tratamiento para todas las ratas tratadas con DSS. Sin embargo, la puntuación fue significativamente inferior en las ratas DSS-OS desde el día 4 hasta el final del estudio. Ninguna de las ratas de los grupos PF mostró diarrea o sangre en las heces en ningún momento del estudio.

Órgano	PF-control	DSS-control	PF-OS	DSS-OS
Gastrocnemius	1,864 ± 0,122	1,635 ± 0,468*	2,098 ± 0,067‡	1,915 ± 0,142*‡
Tibialis anterior	0,122 ± 0,011	0,134 ± 0,028	0,133 ± 0,013	0,131 ± 0,010
Hígado	8,176 ± 0,540	13,849 ± 3,321	11,665 ± 0,888‡	14,197 ± 1,261
Bazo	0,626 ± 0,066	0,854 ± 0,279	0,721 ± 0,098	0,950 ± 0,153
Timo	0,296 ± 0,075	0,187 ± 0,162*	0,556 ± 0,091‡	0,427 ± 0,089*‡
Íleon	1,472 ± 0,186	1,321 ± 0,092	2,305 ± 0,223‡	2,35 ± 0,33
Ciego	0,744 ± 0,051	1,871 ± 0,625*	2,273 ± 0,308‡	2,421 ± 0,450‡
Colon	0,995 ± 0,181	0,939 ± 0,105	1,582 ± 0,256‡	1,570 ± 0,170‡
Peso/longitud colon	0,063 ± 0,006	0,156 ± 0,036*	0,08 ± 0,009	0,103 ± 0,01*‡

Tabla 11-5. Peso de diferentes tejidos en ratas tratadas con DSS alimentadas con diferentes fibras. Los valores representan la media ± EEM (n=10). * P<0,05 vs PF-control. † P<0,05 vs DSS-control, ‡ P<0,05 entre PF-control y PF-OS.

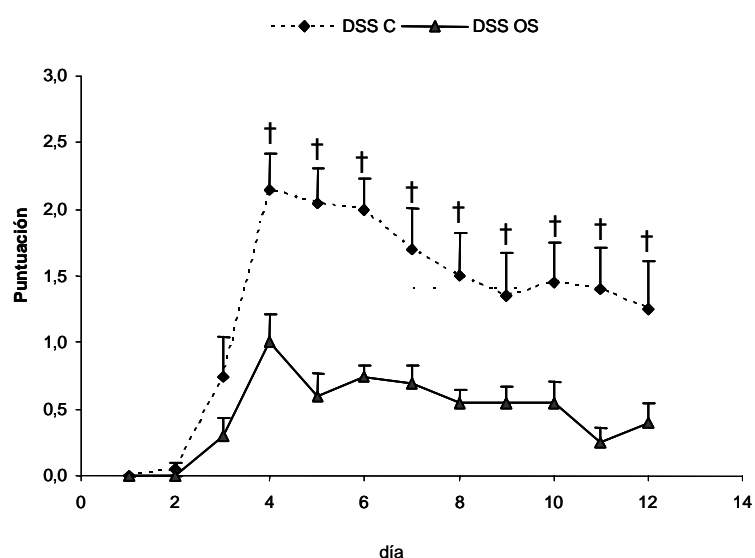


Figura 11-10. Presencia de diarrea y/o sangre en las heces. Desde el comienzo del tratamiento con DSS la presencia de diarrea y sangre en las heces fue evaluada mediante un sistema de puntuación desde 0 (no síntomas) hasta 2,5 (diarrea severa con abundante sangre) (ver apartado 7.3.2). Los valores representan la media ± EEM (n=10). † P<0,05 vs DSS-control.

Análisis histológico de las muestras de colon

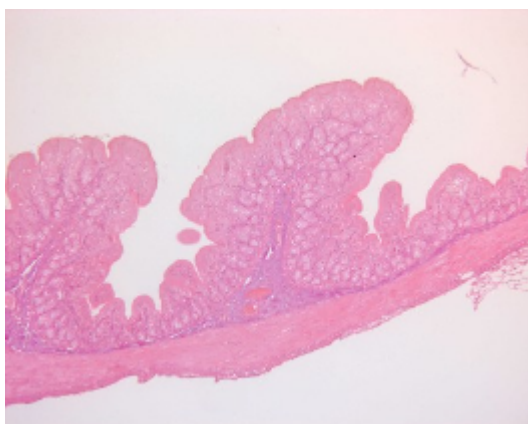
A pesar de la fuerte anorexia no se observaron diferencias en el análisis histológico de las muestras de colon del PF-control y PF-OS, por lo que sólo se muestra una foto de la primera (figura 11-11A).

Comparando las muestras de ratas DSS y PF, el análisis histológico muestra que el tratamiento con DSS causó un daño colónico. La figura 11-11B

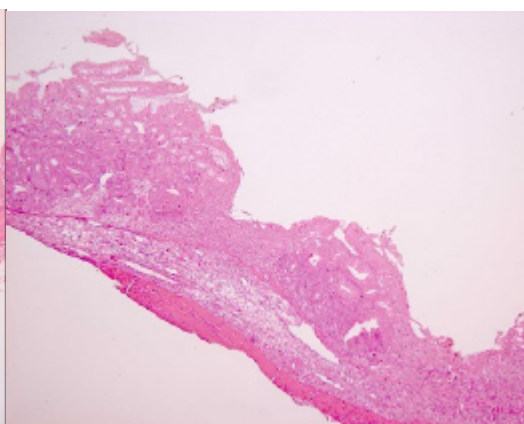
muestra un infiltrado inflamatorio crónico en las muestras de colon de ratas DSS-control, que fue multifocal y afectó a la lámina propia y a la capa submucosa. Por el contrario, en las ratas DSS-OS este infiltrado fue leve y afectó sólo a la lámina propia (figura 11-11C). Este resultado sugiere una mejora del daño colónico en el grupo de animales alimentado con oligosacáridos de leche de cabra.

En general el daño colónico observado fue más leve que el descrito en otros modelos de IBD por DSS, probablemente debido a los 5 días de recuperación.

A: PF-control



B: DSS-control



C: DSS-OS

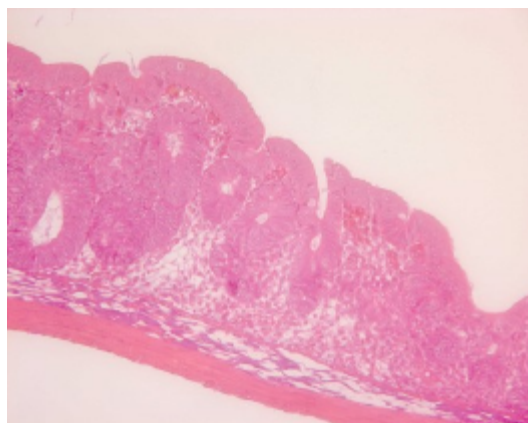


Figura 11-11. Cortes histológicos de mucosa de colon de ratas pair-fed y tratadas con DSS, teñidos con hematoxilina y eosina. A: muestra de rata pair fed-control en la que se observa la histología de una rata sana (50X). B: muestra de rata DSS-control en la que se ve un infiltrado inflamatorio moderado con ulceración en la lámina propia y la submucosa (50X). C: colon de una rata DSS-OS que muestra una recuperación del proceso inflamatorio, sin ulceración y sólo pequeños focos inflamatorios en la lámina propia.

Respuesta inflamatoria al tratamiento con DSS

Los cambios en el peso de determinados tejidos, citados anteriormente, son signos evidentes de la respuesta inflamatoria. Así, el aumento del peso del bazo, aunque no es estadísticamente significativo respecto al PF, probablemente debido al periodo de recuperación, indica un reclutamiento de linfocitos durante el proceso inflamatorio. De la misma forma, en la inflamación puede ocurrir un descenso en el tamaño del timo como consecuencia de la migración de linfocitos hacia el foco inflamatorio. Finalmente, la relación peso/longitud del colon se incrementó también como consecuencia del proceso inflamatorio, originado por el tratamiento con DSS.

De la misma forma que en otros modelos (Mercier S, y col 2002), el tratamiento con DSS causó un aumento en el número de leucocitos, tanto en el grupo control como en el grupo OS (figura 11-12A). De entre todos los leucocitos, los granulocitos fueron los que mostraron el mayor incremento, especialmente en el grupo DSS-control, con un aumento en el porcentaje de granulocitos significativamente superior al del grupo DSS-OS.

La actividad MPO en colon fue significativamente superior en las ratas DSS-control respecto a su PF (figura 11-12B). Sin embargo, en las ratas DSS-OS la actividad MPO, aunque ligeramente superior a la del grupo PF-OS, no fue estadísticamente significativa. Este resultado es coherente con el infiltrado inflamatorio más leve que se observa en las ratas DSS-OS, ya que la actividad MPO es ampliamente aceptada como un marcador de infiltración de neutrófilos (Mercier S y col, 2002).

Concentración de glutatión a nivel de hígado y colon

Aunque está publicado que la inflamación intestinal altera el contenido de glutatión en colon (Mercier S y col, 2002; Rodríguez-Cabezas ME y col, 2002) en nuestro modelo de IBD los niveles de glutatión en colon e hígado de ratas tratadas con DSS no fueron estadísticamente diferentes de los de ratas PF (tabla 11-6). En este sentido habría que destacar que el contenido de glutatión se midió al final del periodo de recuperación y no inmediatamente después del tratamiento con DSS, como en los estudios citados.

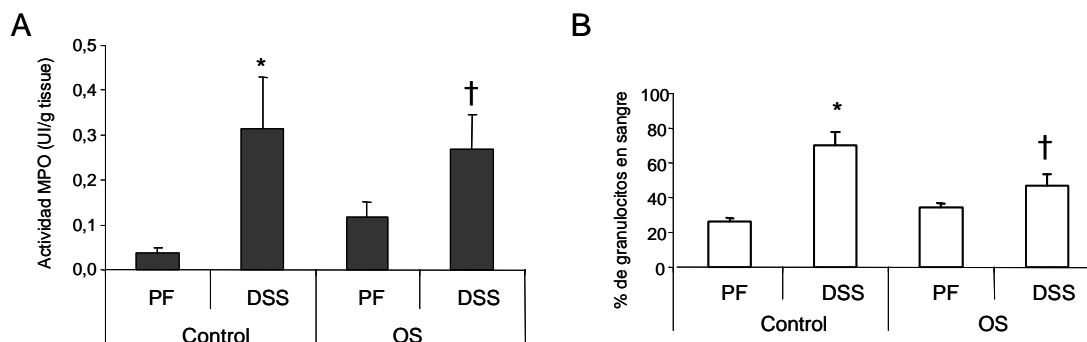


Figura 11-12. Efecto del DSS en la actividad MPO (A) a nivel de colon y el porcentaje de granulocitos en sangre (B). La actividad MPO (UI/g de tejido) se midió por el método de Krawisz y col (2000) como un marcador de la infiltración de neutrófilos. El porcentaje total de granulocitos en sangre se midió con un analizador automático inmediatamente después de su extracción. Los valores representan la media \pm EEM (n=10). * P<0,05 vs PF-control, † P<0,05 vs DSS-control.

Sin embargo sí se observaron diferencias al comparar los dos grupos de ratas enfermas. Los animales del grupo DSS-OS mostraron un contenido de glutatión total y reducido superior al de los del grupo DSS-control, aunque no hubo diferencias en el glutatión oxidado.

En hígado no se observaron diferencias significativas en el contenido de glutatión, aunque sí una fuerte tendencia del glutatión total y reducido a aumentar en los dos grupos de ratas tratadas con DSS (P=0,07 entre DSS-control y PF-control y P=0,08 entre DSS-OS y PF-OS), resultado que coincide con datos ya publicados (Mercier S y col, 2002).

	PF-C	DSS-C	PF-OS	DSS-OS
Hígado				
Total mmol/g	6,04 \pm 0,35	7,36 \pm 1,73	6,99 \pm 1,32	8,87 \pm 0,52
GSH mmol/g	5,71 \pm 0,39	7,07 \pm 1,17	6,54 \pm 1,28	8,40 \pm 0,50
GSSG mmol/g	0,16 \pm 0,03	0,15 \pm 0,03	0,22 \pm 0,02	0,23 \pm 0,02
Colon				
Total mmol/g	2,10 \pm 0,10	1,90 \pm 0,30	2,90 \pm 0,20	2,60 \pm 0,30†
GSH mmol/g	1,98 \pm 0,08	1,77 \pm 0,31	2,08 \pm 0,12	2,47 \pm 0,27
GSSG mmol/g	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,0	0,09 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00†

Tabla 11-6. Efecto del tratamiento con DSS en los niveles de glutatión total, oxidado y reducido en hígado y colon. Los valores representan la media \pm EEM (n=10). † P<0,05 vs DSS-control.

Microbiota fecal y concentración de AGCC en contenido colónico

Comparando ambos grupos de ratas PF, los animales que recibieron oligosacáridos de leche de cabra presentaron un mayor contenido de lactobacilos

y bífidobacterias (tabla 11-7). El incremento observado en aerobios totales podría deberse al mismo aumento de lactobacilos, ya que estas bacterias son capaces de crecer tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. No se observaron diferencias significativas en bacteroides, coliformes ni enterobacterias.

El tratamiento con DSS provocó un incremento en enterobacterias y coliformes, aunque no se observaron cambios en bacteroides. La dieta rica en oligosacáridos de leche de cabra no incrementó de forma significativa el contenido de bacterias probióticas (lactobacilos y bífidobacterias) respecto a la que sólo contenía celulosa, pero sí provocó un descenso de las bacterias potencialmente patógenas como bacteroides, enterobacterias y coliformes.

	PF	PF-OS	DSS-C	DSS-OS
Lactobacilos	9,52 ± 0,07	10,66 ± 0,06‡	9,59 ± 0,26	9,71 ± 0,14
Bifidobacterias	9,35 ± 0,06	10,63 ± 0,07‡	9,58 ± 0,09	9,93 ± 0,17
Bacteroides	9,76 ± 0,19	9,75 ± 0,34	9,70 ± 0,14	9,51 ± 0,08†
Enterobacterias	7,08 ± 0,27	6,33 ± 0,33	9,21 ± 0,40*	7,09 ± 0,28†
Coliformes	7,09 ± 0,35	7,04 ± 0,52	9,31 ± 0,42*	6,96 ± 0,38†
Aerobios totales	9,23 ± 0,23	10,26 ± 0,23‡	10,08 ± 0,22*	9,47 ± 0,10*†

Tabla 11-7. Cambios en la microbiota fecal provocados por el tratamiento con DSS. Los valores representa la media (log cfu/mg de contenido) ± EEM. * P<0,05 vs los controles PF, † P<0,05 vs DSS-control y ‡ P<0,05 entre los dos grupos PF.

Estos resultados sugieren una microbiota fecal más favorable en ratas alimentadas con la dieta rica en oligosacáridos de leche de cabra, lo que podría estar relacionado con la tendencia hacia una mayor concentración de AGCC en el contenido colónico de las ratas PF-OS comparado con las PF-control (5,10 ± 1,56 vs 7,01 ± 1,89 mg/g de contenido colónico, P=0,08). Sin embargo, y en contra de otros datos publicados (Araki Y y col, 2001) no se observó un descenso significativo en la concentración de AGCC en las ratas tratadas con DSS, probablemente debido al periodo de recuperación.

El porcentaje de ácido butírico mostró una tendencia a disminuir en los dos grupos de ratas tratadas con DSS, aunque no se observó un efecto positivo de la dieta rica en oligosacáridos de leche de cabra (21,4 ± 2,75% y 21,9 ± 6,97% para PF-control y PF-OS vs 19,2 ± 2,46% y 18,8 ± 1,49 para DSS-control y DSS-OS).

Análisis de la expresión génica por tecnología de microarrays

La tabla 11-8 resume los cambios observados en la expresión génica, mostrando aquellos inducidos por el tratamiento con DSS y la recuperación en la expresión de estos genes en ratas alimentadas con oligosacáridos de leche caprina. No se observaron cambios significativos entre los dos grupos de ratas PF (datos no mostrados), lo que sugiere que la anorexia no indujo cambios estadísticamente significativos en la expresión de los genes analizados. Este resultado es coherente con la ausencia de daño colónico observado en las ratas PF.

Nos hemos centrado en los genes implicados en el proceso inflamatorio y la función intestinal. Así, el tratamiento con DSS provocó una inhibición parcial de la expresión de genes que codifican para factores de crecimiento con importantes funciones en la maduración y reparación intestinal, como la proteína relacionada con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que se ha relacionado con la defensa y reparación de la mucosa (Hoffmann P y col, 2000). La dieta rica en oligosacáridos de leche de cabra restableció la expresión de este gen hasta valores similares a los de una rata sana. Otro factor de crecimiento implicado en la regulación de la angiogénesis, factor de crecimiento de la placenta (PGF) (Spisni E y col, 1992), también disminuyó su expresión por el tratamiento con DSS y se restableció en el grupo DSS-OS.

La expresión de otro grupo de genes que codifican para las mucinas (MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4 y MUC-5) se vio también disminuida en el grupo DSS-control y su expresión aumentó en las ratas del grupo DSS-OS. En estos últimos genes las diferencias no fueron estadísticamente significativas, pero sí se observó una fuerte tendencia al aumento en su expresión, similar en todos los genes ($P=0,07$).

La expresión del gen que codifica para la fosfatasa alcalina, un marcador de IBD (Sanchez de Medina F y col, 2004), fue inducida por el tratamiento con DSS y su expresión volvió a valores normales en el grupo DSS-OS.

Finalmente la expresión de otro gen implicado en la inflamación, la IL-1 β , una citoquina T_H1 con importantes efectos proinflamatorios se vio fuertemente aumentada por el tratamiento con DSS. La dieta rica en oligosacáridos de leche de cabra mostró un ligero, aunque significativo, descenso en la expresión de esta citoquina.

Por tanto, los oligosacáridos de leche de cabra tuvieron efectos importantes sobre la expresión génica, impidiendo en unos casos y restableciendo en otros, los cambios provocados por el tratamiento con DSS.

Genes	Modificación inducida por DSS	Recuperación en ratas DSS-OS
Genes relacionados con el sistema inmunitario		
IL-18	-2,0	1,7
IL-1 β	9,8	-1,1
Receptor de IL-6	-0,8	-1,6
Receptor de IL-2	-0,7	-1,8
Linfotoxina	-0,2*	3,2*
Receptor de IL-1 tipo 2	-0,9	1,4
Antagonista del receptor de IL-1	-1,4	0,5
Enzima convertora de IL-1 β	2,1	-1,3
IL-10	1,2	3,1
IL-13	-1,4	1,9
Receptor del TNF- α	1,5	-1,5
Receptor del TGF- β	-1,0	4,2
TGF- β 1	-1,4	1,2
TGF- α	3,7	-1,6
TGF- β 2	1,4	2,4
IL-15	-1,7*	1,3*
Cadena D- α del MHCII	3,2*	-1,9*
Factores de crecimiento		
Factor de crecimiento de la placenta	-3,6*	7,5*
Proteína relacionada con el factor de crecimiento epidérmico	-1,7*	1*
Marcadores intestinales de inflamación		
Fosfatasa alcalina	1,5*	-1,8*
Mucinas		
MUC-1	-1,5	1,9
MUC-3	-1,8	1,3
MUC-5	-1,5	3,2
MUC-2	-2,0	1,3
Mucina Intestinal	-4,9	1,7

Tabla 11-8. Efecto del tratamiento con DSS en la expresión de genes implicados en la inflamación y en la función intestinal. Los valores representan la inducción en la expresión comparando las ratas PF-control y DSS-control (1ª columna) o DSS-control y DSS-OS (2ª columna). * representa que el cambio observado es estadísticamente significativo. El resto de los cambios tuvieron un valor de P entre 0,05 y 0,07.

Resumen de los resultados

En este segundo estudio de evaluación del efecto de los oligosacáridos en la inflamación intestinal, se ha utilizado un modelo animal más adecuado para el estudio de la influencia de la dieta en la IBD. Además, a diferencia del estudio

anterior (ver 11.3.1) se utilizó un modelo de inflamación aguda seguido de un periodo de recuperación, para evaluar el efecto de la fibra en la recuperación del epitelio intestinal tras un daño importante.

La fuente de fibra utilizada es una mezcla de fibra soluble e insoluble, más parecida a lo que es habitual en una dieta equilibrada. En este caso como fuente de fibra soluble se han utilizado oligosacáridos aislados a partir de leche de cabra, que a diferencia de los FOS, contienen poca fructosa y son más ricos en galactosa y en ácido siálico, además de tener una mayor variabilidad estructural.

El efecto de la anorexia que conlleva el proceso inflamatorio intestinal ha sido también evaluado mediante la inclusión en el estudio de dos grupos de animales sanos, que consumieron la misma cantidad de dieta que los enfermos. En este sentido el tratamiento con DSS causó una fuerte anorexia en las ratas que debe considerarse como un síntoma de la enfermedad ya que, como se ha visto, provoca importantes cambios en el peso del animal y de determinados tejidos. Los animales que consumieron la dieta con oligosacáridos de leche de cabra no disminuyeron su ingesta de dieta, lo que ya supone una importante mejora respecto a los que consumieron sólo celulosa.

Pero además el proceso inflamatorio *per se* y los efectos derivados del mismo también fueron más débiles en las ratas del grupo OS. Así, la infiltración de neutrófilos y la actividad MPO fueron inferiores en este grupo de animales. También el daño microscópico a nivel del colon indica un efecto beneficioso de los oligosacáridos de leche de cabra en la inflamación intestinal.

El estrés oxidativo originado por el proceso inflamatorio no fue tan evidente en este estudio, probablemente debido al periodo de recuperación, que impidió ver diferencias en los niveles de glutatión en colon e hígado.

Los efectos de las diferentes fibras en la flora fecal bacteriana no fueron tampoco evidentes en las ratas enfermas, a diferencia de lo que ocurrió en el estudio anterior con FOS, y sólo se observaron efectos positivos de los oligosacáridos en la reducción de microorganismos potencialmente patógenos.

Finalmente en este estudio se analizó la modificación de la expresión génica por las diferentes dietas. El tratamiento con DSS provocó importantes cambios en la expresión de genes implicados en la reparación del daño intestinal, como las mucinas o los factores de crecimiento. La expresión de estos genes aumentó en ratas alimentadas con los oligosacáridos de leche de cabra. Además, la mejoría en el proceso inflamatorio, que se había observado en otros

parámetros, también se vio reflejada en la expresión de genes implicados en la inflamación, como demuestra el descenso en la expresión de la IL-1 β .

En resumen los oligosacáridos de leche de cabra parecen tener un importante efecto beneficioso en la colitis inducida por la administración de DSS. En primer lugar, previenen la anorexia típica de las ratas tratadas con este compuesto, lo que ya supone una notable mejora del estado de los animales. Pero además, y en parte debido a la mayor ingesta de dieta, los oligosacáridos de leche de cabra favorecen la recuperación del daño intestinal provocado por el proceso inflamatorio agudo, actuando incluso a nivel de la expresión génica.

12. BIOACTIVIDAD DE LOS PÉPTIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA LECHE DE CABRA.

Son muy pocos los estudios en los que se ha evaluado la bioactividad de péptidos obtenidos a partir de la leche de cabra, a pesar de que sí han sido ampliamente estudiados los derivados de la leche humana y de vaca. Determinados péptidos obtenidos a partir de estas leches han demostrado propiedades inmuno-moduladoras y antiinfecciosas (Clare AD y col, 1999; Baró L y col, 2001) con un gran interés en nutrición infantil.

Dado que el objetivo general de este trabajo es analizar la posible aplicación de la leche de cabra en nutrición infantil, nos pareció interesante evaluar la presencia de péptidos bioactivos en esta leche.

12.1 Obtención de péptidos a partir de las caseínas de la leche de cabra y transporte a través del epitelio intestinal

Partiendo de caseínas de leche de cabra y mediante el método descrito en el apartado 8.1, se obtuvo un hidrolizado proteico que fue sometido a un ensayo de transporte a través de una monocapa de células Caco-2, con objeto de seleccionar aquellos péptidos que pudieran absorberse a nivel intestinal. La integridad de la monocapa se había demostrado previamente por los valores de RTE y permeabilidad al azul de tripán (tabla 12-1).

	0 min	90 min
RET (ohm/cm ²)	1250 ± 165	1103 ± 115
D.O. 595 nm apical	1,21 ± 0,15	1,12 ± 0,18
D.O. 595 nm basolateral	0,028 ± 0,006	0,035 ± 0,02

Tabla 12-1. Estado de la monocapa de células Caco-2 antes (0 min) y después (90 min) del ensayo de transporte. Los valores representan la media de todos los pocillos utilizados ± EEM (n=10).

En el filtrado recogido fueron identificados tres péptidos cuyas secuencias fueron las siguientes:

P1: TGPIPN

P2: SLPQ

P3: SQPK

Estos tres péptidos fueron sometidos a un nuevo ensayo de transporte por separado, para confirmar que realmente atravesaban el epitelio intestinal. A pesar de que los 3 péptidos estaban presentes en el filtrado recogido tras el primer ensayo, sólo el péptido P1 atravesó la monocapa de células Caco-2, ni P2 ni P3 se detectaron en los filtrados recogidos tras este segundo ensayo. Este resultado podría sugerir que ni P2 ni P3 estaban presentes en el hidrolizado y serían generados a partir de péptidos de mayor tamaño por proteasas de las células Caco-2. También podría explicarse por la presencia en el hidrolizado de algún componente que alterara la permeabilidad de la monocapa.

En cuanto al porcentaje de absorción de P1 fue del $5,3 \pm 1,2\%$ frente al $6,5 \pm 1,3\%$ del α -metil-aminoglucósido utilizado como control positivo.

12.2. Actividad antimicrobiana de los péptidos

Dado que algunos péptidos aislados a partir de las proteínas de la leche humana (Liepke C y col, 2001) han demostrado tener una actividad antimicrobiana, nos planteamos si los péptidos obtenidos a partir de la leche de cabra podrían tener también cierta actividad antibiótica.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los 3 péptidos aislados frente a *Escherichia coli*, *Salmonella cholerasuis typhi* y *Streptococcus mutans*. Sólo el P1 dio una cierta actividad antimicrobiana frente a las dos primeras bacterias pero a concentraciones de 300mg/ml, y aun así el halo de inhibición fue 5 veces menor que el obtenido para la solución de ciprofloxacino a 20µg/ml (tabla 12-2).

	Concentración (mg/ml)	Diámetro (mm)		
		<i>E.coli</i>	<i>S.typhi</i>	<i>S.mutans</i>
P1	300	$8,2 \pm 1,5$	$7,4 \pm 2,1$	0
P2	300	0	0	0
P3	300	$0,5 \pm 0,0$	0	0
Ciprofloxacino	0,02	$40 \pm 3,8$	$36 \pm 2,8$	$32 \pm 1,6$

Tabla 12-2. Actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias de los péptidos aislados a partir de las caseínas de la leche de cabra. Las soluciones de los péptidos a evaluar se dejaron difundir en cultivos sólidos de las bacterias durante 12h y transcurrido este tiempo se midió el diámetro del halo de inhibición. Los valores del diámetro representan la media de todos los valores obtenidos en los diferentes ensayos realizados \pm desviación estándar.

A la vista de estos resultados no parece que ninguno de los péptidos aislados tenga una actividad antimicrobiana destacable frente a ninguno de los microorganismos analizados. En los casos en los que se pudiera dar cierta inhibición del crecimiento, las concentraciones (300 mg/ml) son muy elevadas en comparación con los estudios hechos con péptidos de leche humana, que dieron actividad antibiótica en concentraciones diez veces menores (20-40 mg/ml) (Liepke C y col, 2001).

12.3. Efectos inmunomoduladores

Algunos estudios sugieren que determinados péptidos que se obtienen tras la hidrólisis de las proteínas de la leche humana podrían estar implicados en el desarrollo y maduración del sistema inmunitario del recién nacido (Migliore-Samour D y col, 1989). De la misma forma se han aislado péptidos con propiedades inmunomoduladoras a partir de las proteínas de la leche de vaca (Clare DA, 2000). Con estos antecedentes parece interesante comprobar las propiedades sobre el sistema inmunitario de los péptidos obtenidos a partir de la leche de cabra. Para ello se desarrollaron diferentes ensayos *in vitro*, cuyos resultados se describen a continuación.

12.3.1. Actividad sobre macrófagos de ratón:

Efectos sobre la producción de citoquinas

Cuando los macrófagos se activan debido a un estímulo, como puede ser un agente infeccioso, aumentan la producción de determinadas citoquinas que facilitan la defensa frente a dicho agente, entre ellas la IL-12 y el TNF- α . La figura 12-1 muestra que ninguno de los péptidos aislados a partir de la leche de cabra sirve como estímulo de los macrófagos por sí sólo, ya que la incubación con dichos péptidos no aumentó la producción de las citoquinas analizadas. Sin embargo, cuando las células se incubaron en presencia de los péptidos junto con un estímulo específico, como el LPS, sí se observaron algunos efectos.

En lo que respecta a la producción de IL-12 (figura 12-1A), los péptidos no modificaron de forma significativa la activación inducida por LPS, aunque P1 sí mostró una tendencia a disminuir la producción de IL-12. En cuanto a la

producción de TNF- α (figura 12-1B), tanto P1 como P2 aumentaron de forma significativa la estimulación inducida por LPS, y los niveles de TNF- α fueron superiores en presencia de estos dos péptidos.

Estos resultados apuntan a un posible papel beneficioso sobre todo del péptido P2 y en menor medida de P1 en la defensa frente a infecciones, ya que parecen potenciar ligeramente la respuesta de los macrófagos frente a un estímulo infeccioso.

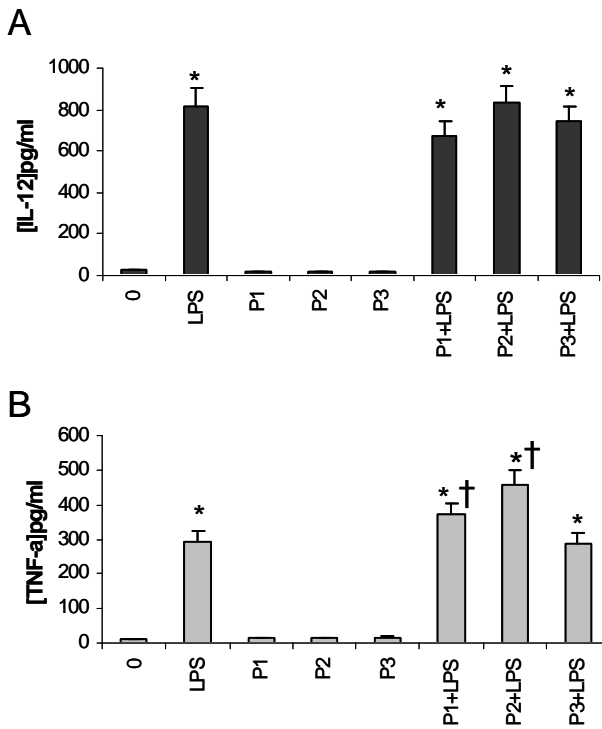


Figura 12-1. Producción de citoquinas por macrófagos en presencia de los diferentes péptidos. Se cultivaron macrófagos derivados de la médula ósea de ratones Balb/C en presencia o ausencia de LPS (50 μ g/ml) y de los péptidos P1, P2 y P3 (100 μ g/ml). Tras 24h de incubación se determinó en el medio de cultivo la concentración de IL-12 (A) y TNF- α (B). Los valores representan la media de varios ensayos realizados (pg/ml) \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y el test a posteriori de Fisher. *P<0,05 vs basal, †P<0,05 vs LPS.

Efecto sobre la capacidad fagocítica

Una de las características más importantes de los macrófagos en la defensa frente a infecciones es su capacidad de fagocitar microorganismos y así eliminarlos. En respuesta a determinados estímulos, como puede ser el LPS, los macrófagos aumentan su capacidad fagocítica preparándose para la defensa del organismo frente a un posible agente infeccioso.

La figura 12-2 muestra cómo al adicionar al medio de cultivo LPS se produjo un incremento significativo del porcentaje de células con capacidad fagocítica. En este caso los péptidos, especialmente P2 y P3, por sí solos

indujeron la fagocitosis de los macrófagos, y de la misma forma, potenciaron el efecto del LPS.

Estos resultados apoyan el efecto beneficioso de los péptidos obtenidos a partir de la leche de cabra en la defensa frente a infecciones. El efecto del péptido P3 es especialmente interesante puesto que estimula la capacidad fagocítica de los macrófagos sin inducir la producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α .

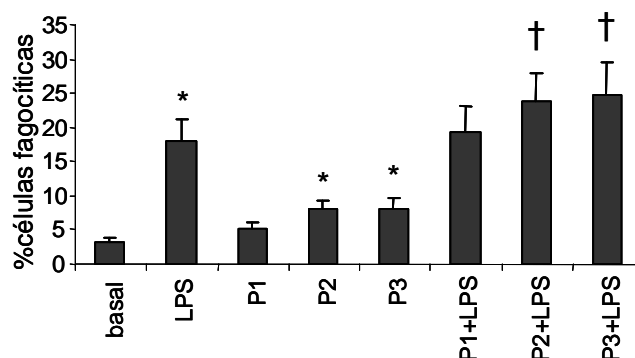


Figura 12-2. % de células fagocíticas en un cultivo de macrófagos de ratón en presencia o ausencia de los diferentes péptidos y LPS. Tras la incubación con los diferentes estímulos las células se incubaron con una cepa de *E.coli* transformada con un vector que expresa la proteína verde fluorescente. Por citometría de flujo se contaron las células que habían fagocitado la bacteria. Los valores representan la media de varios ensayos realizados \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de una vía y el test de Fisher. * $P < 0,05$ vs basal, † $P < 0,05$ vs LPS.

12.3.2. Efecto sobre la proliferación de linfocitos:

Los linfocitos T y B juegan papeles fundamentales en la respuesta inmunitaria celular y humoral. La respuesta de estas células ante un estímulo consiste en su proliferación y diferenciación para producir un perfil de citoquinas que dependerá del estímulo que desencadena la respuesta.

Los linfocitos procedentes del bazo de ratón se cultivaron en presencia de estímulos específicos de linfocitos T (ConA), B (LPS) o en presencia de los péptidos. Sólo P2 fue capaz de modificar la proliferación de linfocitos, en ausencia de otros estímulos y sobre todo en presencia de LPS. Sin embargo, este mismo péptido inhibió la respuesta linfocitaria en presencia de ConA (figura 12-3).

Con estos resultados, se podría decir que P2 es un estímulo específico de linfocitos B y que potencia la respuesta de éstos frente a estímulos específicos

como el LPS, es decir, potencia la respuesta inmunitaria humoral, pero no la celular. Ni P1 ni P3 mostraron efecto alguno sobre la respuesta linfocitaria.

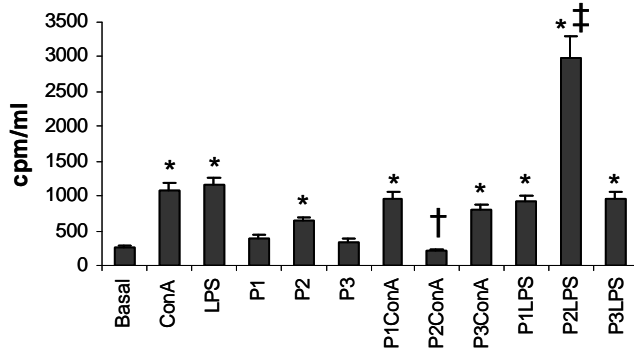


Figura 12-3. Proliferación de linfocitos en presencia de diferentes estímulos. Los linfocitos derivados del bazo del ratón se cultivaron durante 48h en presencia de estímulos específicos de linfocitos T (ConA), B (LPS) o los diferentes péptidos y de ^3H -timidina ($1\mu\text{Ci/ml}$). Tras la incubación se midió la ^3H -timidina incorporada por las células (cpm/ml). Los valores representan la media de los diferentes ensayos realizados \pm desviación estándar. Análisis estadístico por ANOVA de una vía y test de Fisher. * $P < 0,05$ vs basal, † $P < 0,05$ vs ConA, ‡ $P < 0,05$ vs LPS.

12.3.3. Actividad antiinflamatoria por inhibición de la metaloproteinasa-3 (MMP-3):

Las metaloproteasas son una familia de proteasas que, entre otras muchas funciones, se han relacionado con el daño provocado por los procesos inflamatorios (Supuran CT y col, 2003). De hecho un estudio reciente sugiere que la elevada producción de metaloproteasas, y en especial de la MMP-3 o estromalisina-1, podría ser responsable del daño tisular en niños con ECN, ya que estas enzimas tienen la capacidad de degradar la matriz extracelular (Pender SL y col, 2003).

Determinados péptidos de la leche de vaca han demostrado tener actividad inhibidora de algunas proteasas (Clare AD y col, 2000). Por esta razón se decidió determinar la capacidad de inhibición de proteasas por los péptidos de leche de cabra, concretamente se utilizaron metaloproteasas por su implicación en procesos inflamatorios, en especial la ECN.

Como se observa en la figura 12-4 el péptido P1 mostró un efecto inhibidor sobre la MMP-3 incluso superior al del inhibidor proporcionado por el método comercial. Esta actividad no se observó en ninguno de los otros péptidos ensayados.

Aunque el mecanismo de acción no ha sido estudiado, la inhibición de P1 sobre la MMP-3 será probablemente debida a una competición de este péptido y el sustrato del enzima por unirse al sitio de acción, lo que resulta en una menor actividad del enzima sobre su sustrato original.

Así, el péptido P1 que, como ya se había comprobado, no influye en la actividad de los macrófagos, sí tendría un papel beneficioso en procesos inflamatorios y en especial en la ECN en la que la MMP-3 está anormalmente inducida.

12.4. Resumen de los resultados

En primer lugar habría que destacar el carácter preliminar de todos estos resultados. Hay que tener en cuenta que se han evaluado sólo en ensayos *in vitro* relacionados con su capacidad inmunomoduladora y antiinfecciosa. Los resultados obtenidos deben confirmarse en posteriores ensayos *in vivo*, así como en estudios que analicen los efectos dosis-respuesta de estos compuestos.

Además de ser resultados preliminares habría que tener en cuenta que sólo P1 parece absorberse como tal, así que los posibles efectos sistémicos de P2 y P3 sólo estarían presentes en el hidrolizado inicial, ya que parece que su ingesta facilita la absorción de estos péptidos por algún mecanismo que habría que investigar.

Teniendo en cuenta todo esto, los resultados obtenidos en los ensayos de inmuno-modulación sugieren que los 3 péptidos aislados pueden desempeñar papeles reguladores en diferentes procesos inmunitarios.

Así, P3 parece inducir la fagocitosis de macrófagos, sin activar la producción de citoquinas proinflamatorias, lo que podría favorecer la defensa del organismo frente a infecciones.

Por otra parte, el péptido P2 parece tener un efecto inmuno-estimulante más inespecífico, porque estimula la producción de citoquinas por macrófagos así como su capacidad fagocítica. Además potencia la respuesta de los linfocitos B frente a un estímulo. El efecto de este péptido, por ser menos selectivo, debe tomarse con precaución, puesto que se ha visto que estimula la producción de TNF- α que es una citoquina claramente pro-inflamatoria, aunque no es capaz de aumentar su producción por sí solo sino en presencia de LPS.

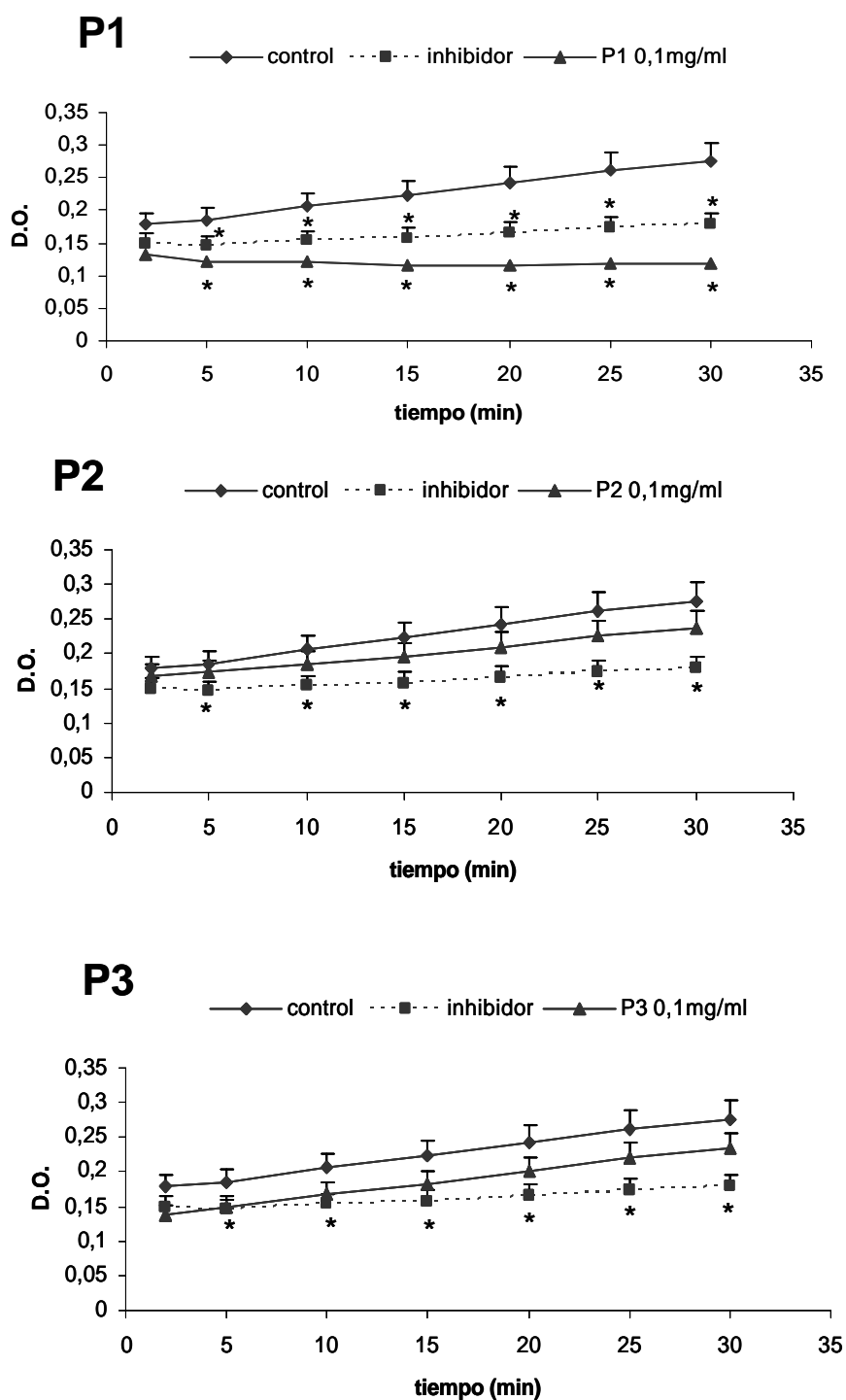


Figura 12-4. Inhibición de la actividad MMP-3 por los péptidos (0,1 mg/ml) obtenidos a partir de leche de cabra. La inhibición actividad MMP-3 se midió mediante un método comercial utilizando como control positivo un inhibidor comercial a una concentración de 0,4 mg/ml. El control representa la actividad de la MMP-3 en presencia de un sustrato específico. Los valores representan la media de varios ensayos realizados \pm desviación estándar. Análisis estadístico por ANOVA de una vía y test de Fisher. * $P < 0,05$ vs control.

Finalmente el péptido P1 tiene un claro efecto inhibitor de la MMP-3, por lo que podría ser de gran utilidad para evitar el daño tisular provocado por un proceso inflamatorio. Además este efecto no va acompañado de una disminución de la actividad de los macrófagos, lo que podría ser perjudicial en caso de infección.

A la vista de todos estos resultados el estudio en profundidad de la bioactividad de los péptidos obtenidos a partir de la leche de cabra, parece un campo de investigación interesante. La influencia que parecen tener sobre el desarrollo y maduración del sistema inmunitario del recién nacido y sus efectos antiinflamatorios los convierten en buenos candidatos a estudiar como nuevos componentes funcionales no sólo en alimentación infantil sino en también en la nutrición del adulto.

Discusión

En la actualidad la gran mayoría de los expertos en nutrición infantil coinciden en que la leche humana debe ser la primera elección para la alimentación del recién nacido. Así queda reflejado en el *Codex Alimentarius* en el que se recomienda la leche humana como único alimento durante al menos los seis primeros meses de vida (*Codex Stan 72-1981*). Sin embargo, la lactancia materna no siempre es posible, por lo que la lactancia artificial juega un papel cada vez más importante en la nutrición del neonato.

En un principio las fórmulas infantiles fueron diseñadas para sustituir a la leche humana y proporcionar los nutrientes requeridos para el correcto crecimiento y desarrollo del recién nacido. Hoy en día este objetivo no es suficiente, y por ello, en la actualidad, la investigación en el campo de la nutrición infantil se centra principalmente en la búsqueda de nuevos componentes bioactivos que imiten las propiedades funcionales de la leche materna. Se trata de conseguir con la lactancia artificial los efectos que se observan en los niños amamantados, así como cubrir las necesidades en aquellos casos en los que son necesarios unos requerimientos especiales.

En este contexto, existen asociaciones de expertos en nutrición infantil que evalúan las diferentes propuestas sobre la composición de las fórmulas infantiles, y emiten informes que generalmente constituyen la base de la legislación que rige dicha composición.

No es fácil introducir nuevos componentes, sobre todo en las fórmulas de inicio, dirigidas a niños de hasta 6 meses de edad, cuyo desarrollo depende de forma casi exclusiva de su alimentación, ya que no tienen la capacidad de autorregulación que irán adquiriendo con el tiempo. De hecho, en los últimos años la introducción de DHA y de oligosacáridos han sido las únicas grandes novedades legalmente aceptadas en la composición de este tipo de fórmulas (Alles MS y col, 2004).

A la hora de introducir nuevos componentes en las fórmulas infantiles son necesarios numerosos estudios clínicos con una muestra de población representativa, que avalen, no sólo la seguridad de la modificación propuesta, sino también su carácter beneficioso respecto a la composición actualmente aceptada. De ahí que algunos informes emitidos por las comisiones de expertos concluyan que determinadas modificaciones, si bien son totalmente seguras para la salud del recién nacido, no son aceptadas por no suponer un claro beneficio respecto a las fórmulas existentes en ese momento.

En el presente trabajo se han evaluado las propiedades funcionales de algunos componentes de la leche de cabra en nutrición infantil. Se han incluido diversos estudios *in vivo* e *in vitro* que demuestran que la leche de cabra contiene compuestos que podrían suponer un beneficio adicional al de las fórmulas infantiles actualmente comercializadas, la mayoría de ellas basadas en la leche de vaca. El objetivo ha sido proponer diferentes modificaciones principalmente centradas en los macrocomponentes de las fórmulas infantiles, y encaminadas a imitar algunos efectos funcionales observados en niños amamantados.

Modificaciones en los macrocomponentes de las fórmulas infantiles

Modificaciones en el componente proteico

Modificaciones relacionadas con el valor nutricional

Respecto a las proteínas que componen las fórmulas infantiles la mayoría de las recomendaciones han ido encaminadas a compensar las deficiencias en aminoácidos de las fuentes proteicas utilizadas, soja o leche de vaca, respecto a la leche humana, con objeto de conseguir un valor nutricional adecuado. Así, el *Scientific Committee on Food* (SCF) en un informe emitido en el año 2003 recomienda que todas las proteínas utilizadas para la elaboración de fórmulas infantiles deben adaptarse al patrón de aminoácidos de la leche materna (*SCF Report*, 2003).

En este sentido la composición en aminoácidos de las leches de vaca y cabra es muy similar, por lo que en ambos casos se requiere una suplementación para cubrir las deficiencias respecto a la leche humana.

También con el objetivo de conseguir un valor nutricional adecuado y mejorar la digestibilidad de las proteínas, se modificó la proporción C/PL de la leche de vaca utilizada en la elaboración de las fórmulas infantiles. Tomando como modelo la leche humana madura, la leche de vaca, con una proporción inicial de 80/20, se modificó de manera que dicha proporción en el componente proteico de las fórmulas infantiles fuera de 40/60.

La digestibilidad de la leche de cabra no ha sido objeto del presente trabajo, pero los pocos estudios que existen en este sentido apuntan a una mejor digestibilidad de la β -lactoglobulina de la leche de cabra (EFSA, 2004). También

las caseínas, al ser más solubles, parecen ser mejor absorbidas que las de vaca (Boza J y col, 1997).

Por tanto, y a la vista de los datos existentes, el valor nutricional de la leche de cabra parece al menos igual de adecuado que el de la leche de vaca para la elaboración de fórmulas infantiles.

Modificaciones relacionadas con el valor funcional

Aparte de su función nutritiva, el componente proteico de las fórmulas infantiles juega otro papel clave en la salud del recién nacido. Así, la APLV es una de las patologías más frecuentes en el neonato, con una incidencia del 2-6% en niños de hasta 2 años de edad (Hill DJ, 1996).

Con objeto de reducir la alergenicidad de las proteínas de la leche de vaca, la aproximación más comúnmente utilizada es la hidrólisis enzimática de dichas proteínas. De esta manera se consiguen péptidos de pequeño tamaño, que no inducen una respuesta alérgica pero tampoco una tolerancia a las proteínas de la leche de vaca (Exl BM y col, 2001).

Los resultados de este trabajo sugieren que la hidrólisis de las proteínas mediante bacterias probióticas podría ser otra forma de reducir la alergenicidad de las proteínas de la leche de vaca. Además, de esta forma el neonato podría beneficiarse de la presencia de los probióticos, ya que, recientes estudios apuntan a un posible papel preventivo de estas bacterias en la APLV (Isolauri E, 2004). Otros resultados no publicados obtenidos por nuestro grupo indican un claro efecto inmuno-modulador de las bacterias probióticas, que también podría ser beneficioso para el neonato.

En este trabajo se propone la leche de cabra como alternativa a la de vaca en niños no sensibilizados, ya que, como se ha comentado ampliamente no es una buena alternativa en niños con APLV diagnosticada. Se ha evaluado por primera vez la leche de cabra comparada con la de vaca en un modelo de APLV. Los resultados sugieren que la leche de cabra es menos alergénica que la de vaca, cuando se administra a animales no sensibilizados frente a esta última.

Aunque la razón necesita ser investigada en mayor profundidad, esta menor alergenicidad podría ser debida a la ausencia de α 1-caseína en la leche de cabra, ya que este es uno de los principales alérgenos de la leche de vaca (Bellioni-Businco B y col, 1999). Esta proteína actúa como un transportador de

otros alérgenos y por tanto su ausencia podría favorecer la digestión de estos otros alérgenos, principalmente de la β -lactoglobulina, lo que también contribuiría a la menor alérgenicidad de la leche caprina (Bevilacqua C y col, 2001).

Esta hipótesis de que una reducción en la fracción caseínica de la leche reduce la alérgenicidad ha sido confirmada por nuestros resultados. La leche de vaca con una relación C/PL de 40/60 ha demostrado ser menos alérgica en el modelo de APLV utilizado, comparada con la nativa cuya relación C/PL es de 80/20. Por tanto, la modificación de la relación C/PL de la leche de vaca utilizando como modelo la leche humana, no solo consigue mejorar la digestibilidad, sino que reduce la alérgenicidad de las proteínas lácteas.

Aparte de facilitar la digestión de la β -lactoglobulina, otra posible explicación de la menor alérgenicidad de una fórmula con menor contenido en caseínas, podría estar relacionada con la flora intestinal del recién nacido. Balmer SE (1989) comparó el efecto sobre la flora fecal de una fórmula infantil a base de proteínas de lactosuero bovino con otra a base de caseínas también bovinas. Sus resultados demostraron una mayor colonización por lactobacilos y bífidobacterias en los niños alimentados con la fórmula a base de proteínas del lactosuero. Como ya se ha comentado, estas bacterias probióticas podrían tener un papel importante en la prevención de la APLV, por lo que el mayor contenido en proteínas del lactosuero favorecería una flora fecal protectora frente a la APLV.

Finalmente, comparando los efectos de las leches de cabra y de vaca sobre el sistema inmunitario, se ha comprobado que la leche caprina aumenta la concentración plasmática de IL-10. Esta citoquina es una de las responsables de la respuesta T_H3 , que inhibe tanto las respuestas T_H2 como la T_H1 , lo que podría contribuir a la menor alérgenicidad de la leche de cabra. Estudios llevados a cabo por nuestro grupo ya han demostrado que la mayor producción linfocitaria de IL-10 tiene efectos antialérgicos en ratones (Sierra S y col, 2004).

A la vista de estos resultados parece interesante considerar la posibilidad de utilizar la proteína de la leche de cabra en las fórmulas infantiles, ya que su alérgenicidad en niños no sensibilizados podría ser menor, probablemente debido al bajo contenido en $\alpha 1$ -caseína.

Modificaciones en la fracción lipídica

El componente lipídico de las fórmulas infantiles ha sido uno de los principales objetivos de las modificaciones en las fórmulas de inicio y de continuación. De hecho, la adición de AGPI-CL, concretamente DHA y AA, ha sido una de las variaciones aceptadas en la composición de las fórmulas de inicio. Hay fuertes evidencias de que estos dos ácidos grasos podrían ser responsables del mayor desarrollo cognitivo de los niños amamantados (Alles MS y col, 2004). DHA y AA están presentes en la leche materna, pero no en los aceites vegetales comúnmente utilizados en la elaboración de las fórmulas infantiles. Por esta razón diferentes asociaciones de expertos recomendaron su adición a dichas fórmulas, y así se recoge actualmente en el *Codex Alimentarius* (Codex Stan 72-1981) y en diferentes legislaciones europeas, entre ellas la española (RD 72/1998).

Aunque el componente lipídico de las fórmulas no ha sido objeto de este trabajo, la principal diferencia entre las leches de vaca y cabra es el mayor contenido de TCM de la primera. De hecho, comparando las dietas a base de leche de cabra y de vaca utilizadas en este trabajo (ver apartado 6.1.1), el porcentaje de ácidos grasos de cadena media fue muy superior en la de cabra (18,7% vs 7,3%). Estos triglicéridos suponen una fuente de energía de muy fácil acceso (ver apartado 3.2.2), por lo que su presencia en las fórmulas infantiles podría ser beneficiosa para el neonato, cuyo metabolismo es aún inmaduro, especialmente en el caso de niños de bajo peso al nacer (Chan S y col, 1998). En la bibliografía existen estudios que demuestran que la relación TCM/TCL es importante para la función energética del neonato (Telliez F y col, 2002). Sin embargo, en lo que respecta a los efectos de unos y otros a largo plazo hay datos contradictorios y serían necesarios más estudios para dilucidar el papel de los TCM en la salud del neonato (Klenoff-Brumberg HL y col, 2003).

Modificaciones en el componente glucídico

El principal hidrato de carbono de la leche materna y de las fórmulas infantiles es la lactosa, que además supone la mayor fuente de energía para el recién nacido. Sin embargo, el descubrimiento en la leche materna de oligosacáridos con una importante bioactividad, hizo que la investigación de estos compuestos cobrara un gran interés.

Los oligosacáridos son el tercer componente mayoritario de la leche materna, con una cantidad de 0,7-1,2 g/100ml. De entre los efectos funcionales que se les han asignado a estos azúcares, cabe destacar su papel prebiótico, favoreciendo de forma selectiva el crecimiento de bacterias ácido lácticas y bífidobacterias, lo que genera una flora fecal más beneficiosa para el neonato (Mc Veagh P y col, 1997). Además la estructura de estos compuestos es muy similar a la de los puntos de anclaje de bacterias patógenas a las células intestinales, por lo que los oligosacáridos bloquean estos puntos de anclaje impidiendo la adhesión de las bacterias al epitelio intestinal (Kunz C y col, 2000). Por todo ello, se ha sugerido que los oligosacáridos presentes en la leche materna podrían ser parcialmente responsables de la menor incidencia de diarrea en los niños amamantados (Newburg SN y col, 1995).

En la leche de vaca sólo se encuentran trazas de oligosacáridos, y por tanto, en las fórmulas infantiles el contenido en estos compuestos es muy bajo. Dado el gran número de estudios que sugieren un efecto beneficioso de los oligosacáridos, en el año 2001 el SCF consideró que había datos suficientes para aceptar la adición a las fórmulas infantiles de inicio y de continuación de un máximo de 0,8g/100ml de una mezcla de GOS al 90% y FOS al 10% (SCF Report, 2001).

La leche de cabra, en comparación con la de vaca, tiene un alto contenido en oligosacáridos (0,025-0,030 g/100ml). Además su variabilidad estructural y su riqueza en galactosa y ácido siálico los hacen similares a los de la leche materna (Martínez-Férez A, 2004), como se demuestra por el análisis del producto que ha sido objeto de este trabajo (ver tabla 11-1).

A pesar de ello, la bioactividad de los oligosacáridos de leche de cabra no había sido estudiada. Como se discutirá más adelante, nuestros resultados muestran que estos compuestos tienen una cierta actividad antiinfecciosa. Además estos compuestos han demostrado un efecto protector sobre la inflamación intestinal en ratas.

Por tanto, los oligosacáridos de la leche de cabra podrían ser candidatos a mejorar las propiedades funcionales de las fórmulas infantiles.

Beneficios de estas modificaciones en la salud del recién nacido: protección frente a patologías frecuentes en el neonato

Como ya se ha comentado, la búsqueda de nuevos componentes en las fórmulas infantiles tiene como objeto imitar las propiedades funcionales de la leche humana. Por tanto, nuestro objetivo no era solo identificar componentes de la leche de cabra que pudieran utilizarse en nutrición infantil, sino también demostrar que estos componentes suponían un beneficio adicional para la salud del recién nacido.

Con este objetivo se evaluaron los componentes de la leche caprina en diversas patologías frecuentes en el neonato, principalmente APLV, ECN e infecciones gastrointestinales.

Las proteínas de la leche de cabra en la prevención de la APLV

Alergenicidad de la leche de cabra

Como ya se ha comentado ampliamente, la leche de cabra no es una buena alternativa a la de vaca en niños ya sensibilizados frente a la proteína de la leche de vaca, ya que existe reactividad cruzada entre ambos tipos de proteína (ver apartado 4.1.4).

El estudio recogido en este trabajo es el primero que compara la alergenidad de las leches de vaca y de cabra en un modelo de APLV. Se utilizaron ratones al destete, es decir que hasta la primera dosis de sensibilización sólo se habían alimentado con la leche de su madre y, por tanto, no podían estar sensibilizados frente a las proteínas de la leche de vaca. Nuestros resultados demuestran que, en estas condiciones, las proteínas caprinas son menos alergénicas, ya que los ratones que recibieron leche de cabra sufrieron menos síntomas, tanto durante el periodo de sensibilización como después de la dosis de choque. La leche de cabra no produjo una inducción significativa de la respuesta T_H2 , responsable de la alergia, como se demuestra por el patrón de citoquinas producido por los linfocitos y la menor proliferación de estos.

Esta menor alergenidad podría suponer un beneficio para el neonato, no sólo en sus primeros meses de vida, sino también en edades posteriores. Como ya se ha comentado, la APLV predispone al niño a padecer otros fenómenos de

alergia (rinitis, asma, otras alergias alimentarias, etc), ya que durante el periodo de sensibilización el sistema inmunitario está anormalmente estimulado y puede reaccionar frente a otros antígenos inofensivos, que no inducirían reacción en condiciones normales (Boccafogli A y col, 1994; Kjellman N-IM y col, 1998). En este sentido, la menor capacidad de sensibilización de la leche de cabra podría suponer un beneficio. Los resultados que se recogen en este trabajo, aunque son muy preliminares, apuntan a que efectivamente los ratones que recibieron leche de cabra tuvieron una menor reacción frente a la ovoalbúmina, administrada durante el periodo de sensibilización. Evidentemente, se necesitan estudios clínicos a largo plazo para confirmar esta hipótesis, pero parece un campo de investigación de un gran interés.

Por otra parte, la reactividad cruzada que existe entre las proteínas de las leches de vaca y de cabra (Restani P y col, 1999), permite pensar que las proteínas caprinas podrían inducir tolerancia frente a las bovinas. Aunque no existen estudios al respecto, esta tolerancia podría ser otro beneficio añadido, ya que evitaría posteriores fenómenos de rechazo de las proteínas de vaca. La no inducción de tolerancia es uno de los principales problemas que plantean las fórmulas extensamente hidrolizadas y las de soja, que son las alternativas actualmente utilizadas en niños con APLV.

Posicionamiento de la European Food Safety Authority (EFSA)

Recientemente se ha publicado un artículo de posicionamiento de la EFSA acerca de la utilización de la leche de cabra en alimentación infantil (EFSA, 2004). Este informe está basado en varios estudios:

- un estudio clínico en niños sanos en el que se compara una fórmula basada en leche de cabra no modificada con otra basada en leche de vaca adaptada a la leche humana. Se hizo un seguimiento de los niños desde el nacimiento hasta los 5 meses de edad.
- análisis de la digestibilidad de las proteínas de las leches de vaca y cabra en un modelo animal.
- estudios *in vitro* para determinar el contenido en aminoácidos de una fórmula infantil basada en leche de cabra no modificada.

Tras la evaluación de los resultados de estos estudios la EFSA concluye que el patrón de aminoácidos de la leche de cabra no se ajusta al de la leche humana, y que por tanto, esta leche no es adecuada para la nutrición infantil. Sin embargo, en el mismo informe se recoge que dicho patrón de aminoácidos no es tampoco adecuado en la leche de vaca. En cualquiera de los casos sería necesario modificar la proteína (invertir la relación C/PL) y añadir los aminoácidos necesarios para ajustar el perfil al de la leche humana.

En cuanto a la digestibilidad, el informe concluye que ambas proteínas son bien digeridas, pero que la proteína de la leche de cabra tiene un valor nutritivo más elevado, porque con el mismo consumo da una mayor tasa de crecimiento, en el modelo animal utilizado. Además, la β -lactoglobulina de cabra fue más fácilmente digerida que la de vaca, lo que apoya la teoría de que la ausencia de α -caseína favorece la digestibilidad de esta proteína.

Respecto a la alergenicidad la EFSA no encuentra datos que apoyen la menor alergenicidad de la leche caprina, pero este comentario está basado en estudios en niños con APLV diagnosticada, en los que, como ya se ha comentado ampliamente, la leche de cabra no es un alternativa válida.

Finalmente, aunque las fórmulas a base de leche de vaca y de cabra fueron bien toleradas y no hubo diferencias en el crecimiento de los niños, el informe concluye que no hay datos suficientes que avalen la utilización de la leche de cabra en nutrición infantil.

En este contexto se puede concluir que, aunque son necesarios estudios clínicos con una población infantil representativa, la leche de cabra tras las modificaciones adecuadas, podría ser una alternativa válida para reducir la incidencia de APLV.

La leche de cabra en la inflamación intestinal

Efectos de los oligosacáridos

La inflamación intestinal no es muy frecuente en los neonatos nacidos a término, pero sí en los prematuros y de bajo peso al nacer, entre los cuales hay una incidencia del 11% de ECN, patología intestinal que cursa con inflamación, y que está muy relacionada con el consumo de fórmulas infantiles (Precioso AR y col, 2002).

En esta patología la flora intestinal juega un papel fundamental (Shanahan y col, 2004), como se demuestra por el hecho de que animales “libres de microorganismos” no desarrollan la enfermedad (Chandran P y col, 2003). Por ello, la manipulación terapéutica de dicha flora ha cobrado un gran interés, y diferentes estudios en modelos animales de IBD sugieren que la administración de probióticos puede ser beneficiosa (Araki Y y col, 2004; Perán L, y col 2005). Incluso se ha demostrado que las bifidobacterias protegen a las ratas del desarrollo de la ECN (Vandenplas Y, 2002).

Pero la administración de probióticos no es el único modo de manipular la flora intestinal. Recientemente se ha despertado un gran interés en la administración de prebióticos, para favorecer el crecimiento de bacterias ácido-lácticas y bifidobacterias.

Nuestros resultados muestran que la administración de FOS previene el daño intestinal originado por el tratamiento con TNBS. En este estudio se observó un claro efecto sobre la flora intestinal, ya que el grupo que consumió FOS presentó una mejor relación entre bacterias probióticas y patógenas, que podría explicar el efecto beneficioso de estos compuestos en la inflamación intestinal. No obstante, los animales alimentados con FOS, aunque mejoraron significativamente respecto a los que recibieron celulosa, tuvieron síntomas evidentes de la enfermedad: elevada actividad MPO, reducción en los niveles de glutatión y lesiones a nivel del colon. Una posible explicación es que la lesión causada por el TNBS se da en el colon distal, y estos compuestos son fermentados principalmente en las primeras porciones del intestino grueso (ciego y colon proximal). Aparte de este inconveniente la ingesta del 100% de la fibra en forma de FOS no es una aproximación real.

Los oligosacáridos de leche de cabra, a diferencia de los FOS, son ricos en galactosa y más parecidos a los que se encuentran en la leche humana. De hecho, como ya se ha comentado, la legislación permite adicionar a las fórmulas una mezcla de oligosacáridos constituida en un 90% por GOS. Además estos compuestos fueron evaluados en un modelo de colitis por DSS, más adecuado para la evaluación del efecto de estos compuestos porque la lesión afecta a todo el colon y en algunos casos al ciego e incluso al íleon (Charles O Elson y col, 1995). Los resultados obtenidos en este caso muestran que los oligosacáridos no sólo protegieron a los animales de la anorexia provocada por el tratamiento con

DSS, sino que tuvieron un claro efecto beneficioso en la recuperación del daño a nivel del colon inducido por este compuesto.

El efecto de los oligosacáridos de leche de cabra sobre la flora intestinal no fue del todo claro. Se observó un aumento significativo de las bifidobacterias en los animales sanos que consumieron estos compuestos, lo que concuerda con los resultados del ensayo *in vitro* de fermentación (ver apartado 11.2.2). A pesar de ello, no hubo diferencias significativas ni en lactobacilos ni en bifidobacterias en las ratas enfermas, y sólo se observó una disminución de las bacterias patógenas en los animales que consumieron los oligosacáridos. Por tanto, parece que, en este caso, el efecto protector no es sólo debido a la capacidad prebiótica de estos azúcares.

Nuestros resultados *in vitro* demuestran que los oligosacáridos caprinos son capaces de inhibir la adhesión de las bacterias patógenas al epitelio intestinal, lo que podría ser una explicación a la menor presencia de estas bacterias en el colon de los animales que los consumieron.

Otra posible explicación del papel protector de estos compuestos sería su capacidad para inducir la síntesis de mucoproteínas. Aunque en este trabajo no se ha medido dicha síntesis, sí se ha comprobado que el tratamiento con DSS induce una disminución en la expresión de los genes que codifican para las mucinas. Los oligosacáridos de la leche de cabra indujeron un aumento en la expresión de estos genes hasta valores similares a los de ratas sanas.

Recientemente se ha sugerido que los oligosacáridos de la leche humana tienen un efecto antiinflamatorio directo, por inhibición de la migración de leucocitos al foco inflamatorio (Bode L y col, 2004). Ensayos similares se han llevado a cabo con oligosacáridos de leche de cabra con resultados prometedores (Martínez-Férez A, 2004). Para ejercer este efecto antiinflamatorio sería necesario que los oligosacáridos se absorbieran a nivel intestinal, lo que parece probable a la vista de nuestros resultados en el modelo de epitelio utilizado (monocapa de células Caco-2).

Por tanto, los oligosacáridos de leche de cabra parecen tener un claro efecto beneficioso en la inflamación intestinal. Aunque se necesitarían más estudios para confirmarlo, parece que este efecto no es sólo debido a la capacidad prebiótica de estos azúcares, sino que existen efectos directos sobre la inflamación y la reparación del daño intestinal.

Efectos de los péptidos de la leche de cabra

Aunque el efecto de los péptidos de la leche de cabra sobre la inflamación intestinal no se ha evaluado en este trabajo, nuestros resultados *in vitro* demuestran que uno de ellos, concretamente P1, tiene la capacidad de inhibir la actividad MMP-3. Se ha sugerido que este enzima, por su capacidad de degradar la matriz extracelular de la mucosa, podría ser responsable del daño tisular en niños con ECN (Pender SL y col, 2003). La capacidad de inhibir este enzima por parte del péptido mencionado sugiere un posible papel preventivo de éste sobre el daño tisular típico de la ECN.

Por tanto, parece interesante el estudio de los efectos de P1 sobre la inflamación intestinal, ya que además nuestros resultados demuestran que este péptido, generado por hidrólisis enzimática de las caseínas de la leche de cabra, atraviesa intacto el epitelio intestinal.

La leche de cabra en la defensa frente a infecciones

Una de las principales ventajas de la lactancia materna respecto a la artificial consiste en la protección que confiere frente a infecciones, especialmente intestinales, que son muy frecuentes en el recién nacido, cuyo sistema inmunitario es aún inmaduro (Nascimento MBR do, 2003). Por esta razón, la búsqueda de nuevos componentes que favorezcan la defensa frente a este tipo de infecciones es un importante campo de investigación en nutrición infantil.

Propiedades antiinfecciosas de los oligosacáridos de la leche de cabra

El establecimiento de una flora intestinal beneficiosa es fundamental en la defensa frente a infecciones gastrointestinales, ya que dicha flora impide la invasión de microorganismos patógenos. Así, la manipulación de las bacterias que colonizan el intestino es una de las principales medidas en la prevención de este tipo de patologías (Reid G y col, 2004).

En nutrición infantil el objetivo que se plantea es conseguir con las fórmulas una flora intestinal similar a la de los niños amamantados, en los que las bifidobacterias y lactobacilos son las especies dominantes (Vandenplas Y y col, 2002). Con este objetivo se han adicionado bacterias probióticas a las fórmulas

infantiles, consiguiendo una flora similar a la de niños amamantados y una disminución en la incidencia de diarrea por infecciones (Langhendries col, 1995; Saavedra, 2000). Pero esta medida tiene el inconveniente de que es necesario administrar las bacterias vivas, lo que necesita unas condiciones especiales en la preparación de las fórmulas.

La adición de oligosacáridos a fórmulas infantiles también ha conseguido imitar la flora de niños amamantados, sin el inconveniente tecnológico comentado (Moro G y col, 2002). En este sentido nuestros resultados muestran que los oligosacáridos de la leche de cabra podrían tener un efecto protector frente a infecciones por su capacidad para promover selectivamente el crecimiento de bifidobacterias, principales constituyentes de la flora de niños amantados (ver figura 1-3).

Además de este efecto bifidogénico, los oligosacáridos de la leche de cabra han demostrado un efecto inhibidor de la adhesión de determinados microorganismos patógenos (*E.coli* y *Listeria monocytogenes*) al epitelio intestinal. Este efecto podría deberse a la similitud estructural de estos compuestos y los puntos de anclaje de estas bacterias, aunque este aspecto no ha sido investigado en este trabajo.

Tanto por su capacidad de generar una flora intestinal protectora como por la inhibición de la adhesión de microorganismos patógenos, los oligosacáridos de leche de cabra parecen buenos candidatos en la mejora de la protección del recién nacido frente a infecciones.

Propiedades inmunomoduladoras de los péptidos bioactivos

Determinados péptidos obtenidos a partir de la leche humana han demostrado su capacidad para inhibir de forma directa el crecimiento de determinados microorganismos (Liepke C y col, 2001), lo que podría contribuir a las propiedades antiinfecciosas de la lactancia materna.

Los péptidos obtenidos a partir de las caseínas de la leche de cabra no mostraron un efecto antimicrobiano importante, pero sí ciertas propiedades inmuno-moduladoras que podrían favorecer la defensa del organismo frente a infecciones. Especialmente el péptido P3 estimuló la actividad fagocítica de macrófagos por sí sólo y en presencia de un estímulo, sin modificar la producción de citoquinas. El efecto del péptido P2 es menos selectivo, ya que estimuló no

sólo la fagocitosis si no también la producción de citoquinas proinflamatorias por macrófagos (TNF-a), por lo que este efecto debe tomarse con mayor precaución.

Esta capacidad de modular el sistema inmunitario también ha sido descrita en algunos péptidos de la leche de vaca (Clare DA, 2000; Gill HS y col 2000). Los péptidos bovinos han sido más ampliamente estudiados, en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, y se ha sugerido que podrían favorecer la maduración del sistema inmunitario del neonato (Gill HS y col, 2000).

A la vista de los resultados obtenidos para la leche de vaca, parece interesante estudiar en mayor profundidad los péptidos de la leche de cabra. Además nuestros resultados sugieren que algunos de ellos podrían ejercer efectos sistémicos ya que atraviesan el epitelio intestinal y podrían llegar intactos a la circulación sanguínea.

Posibles formulaciones infantiles basadas en ingredientes aislados a partir de leche de cabra

Dado que el objetivo final de este trabajo es utilizar la leche de cabra como fuente de ingredientes funcionales para la nutrición infantil, en este apartado se proponen fórmulas infantiles que contienen dichos ingredientes.

Aunque, como ya se ha comentado ampliamente, la utilización de leche de cabra en la alimentación del neonato no está permitida actualmente, las fórmulas propuestas cumplen con los requisitos nutricionales establecidos para las fórmulas infantiles y, en base a nuestros resultados, podrían suponer un beneficio adicional para la salud del recién nacido respecto a las fórmulas disponibles en el mercado.

Fórmula de Inicio (0-6 meses)

Por 100 g		
Proteínas	g	12,1
Proteínas suero cabra	g	7,3
Caseína cabra	g	4,8
Taurina	mg	34
Grasas	g	25,6
Grasa de leche	g	5,4
Aceites vegetales	g	20,2
Ácido linoleico	g	4,3
Ácido linolénico	mg	607
DHA	mg	20
Carbohidratos	g	55,9
Lactosa	g	54,9
Oligosacáridos	g	1
Humedad	%	2,5
Energía	Kcal	502
Vitaminas		
A	UI	1900 (570 mg)
D3	UI	350 (8.75 mg)
E	mg	13
K1	mcg	60
C	mg	52
B1	mg	0,55
B2	mg	1.1
Niacina	mg	8
Ácido pantoténico	mg	3
B6	mg	0.4
B12	mcg	2.1
Ácido fólico	mcg	72
Biotina	mcg	20
Minerales	g	1,6
Na	mg	130
K	mg	500
Cl	mg	350
Ca	mg	410
P	mg	220
Mg	mg	35
Fe	mg	6
Zn	mg	3,9
Cu	mcg	350
Mn	mcg	40
I	mcg	68
Selenio	mcg	7
Nucleótidos		
AMP	mg	2,2
UMP	mg	2,6
GMP	mg	0,73
IMP	mg	1,46
Otros componentes		
Colina	mg	65
M-Inositol	mg	25
L-Carnitina	mg	8

Fórmula de continuación (6-12 meses)

Por 100 g		
Proteínas	g	17
Proteínas suero cabra	g	10,25
Caseína cabra	g	6,74
Taurina	mg	34
Grasas	g	20,1
vegetable oils	g	16,8
grasa de leche	g	3,3
Ácido linoleico	g	2,35
Ácido linolénico	mg	235
DHA	mg	20
Carbohidratos	g	55
Lactosa	g	47,9
Oligosacáridos	g	1,6
Humedad	%	2,1
Energía	Kcal	467
Vitaminas		
A	UI	1900 (570 mg)
D	UI	350 (8.75 mg)
E	mg	13
K	mcg	60
C	mg	50
B1	mg	0.55
B2	mg	1.1
Niacina	mg	8
Ácido pantoténico	mg	3
B6	mg	0.5
B12	mcg	2
Ácido fólico	mcg	72
Biotina	mcg	20
Minerales	g	1,6
Na	mg	140
K	mg	548
Cl	mg	350
Ca	mg	337
P	mg	220
Mg	mg	40
Fe	mg	9
Zn	mg	3,9
Cu	mcg	400
Mn	mcg	40
I	mcg	68
Selenio	mcg	11
Nucleótidos		
AMP	mg	2,2
UMP	mg	2,6
GMP	mg	0,73
IMP	mg	1,46
Otros componentes		
Colina	mg	65
M-Inositol	mg	25
L-Carnitina	mg	8

Conclusiones

Como resultado de la investigación que se describe en esta Tesis Doctoral se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Las modificaciones en el componente proteico de las fórmulas infantiles investigadas reducen la alergenicidad de dicho componente, disminuyendo el riesgo de padecer APLV y otros fenómenos de sensibilización. Así se puede concluir que:

- 1.1. La leche de cabra es menos alergénica que la de vaca cuando ambas se administran a ratones al destete, ya que induce una menor sensibilización de los linfocitos, favoreciendo el equilibrio entre las respuestas inmunitarias de tipo T_H1 y T_H2 .
- 1.2. Esta menor alergenicidad de la leche de cabra previene la sensibilización de los ratones frente a otros alérgenos, concretamente la ovoalbúmina.
- 1.3. La proporción caseínas/proteínas del lactosuero juega un papel fundamental en la alergenicidad de la leche de vaca. Se ha demostrado que la disminución de la fracción de caseínas de la leche de vaca hasta una proporción de 40/60 reduce su alergenicidad.
- 1.4. La hidrólisis de las proteínas de la leche de vaca por dos bacterias probióticas, concretamente *Lactobacillus coryniformis* y *Lactobacillus gasserii*, da como resultado un hidrolizado que es menos alergénico que la leche de vaca.

2. Los efectos de las leches de vaca y cabra sobre el sistema inmunitario de ratones sanos son muy similares. La principal diferencia encontrada es la mayor concentración plasmática de IL-10 en los ratones alimentados con una dieta en polvo a base de leche de cabra, así como la menor concentración de IgG1 e IgG en el plasma de estos mismos ratones.

3. Los oligosacáridos de la leche de cabra tienen una actividad funcional a nivel gastrointestinal que se puede concretar en los siguientes efectos:

3.1. Inhibición de la adhesión a células intestinales de microorganismos patógenos, concretamente *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* subespecie *Ohio*.

3.2. Estos azúcares tienen un efecto prebiótico, ya que son fermentados por bacterias probióticas como *Bifidobacterium animalis* y no por bacterias patógenas.

Ambos resultados sugieren un efecto beneficioso de los oligosacáridos de leche de cabra sobre la flora bacteriana intestinal.

3.3. De entre los oligosacáridos aislados a partir de la leche de cabra se han encontrado al menos dos compuestos, ácido siálico y 3-sialil-lactosa, con la capacidad de atravesar una monocapa de células intestinales (Caco-2), lo que sugiere que podrían absorberse a nivel de intestino.

3.4. La inclusión de oligosacáridos de leche de cabra en la dieta de ratas con colitis inducida por sulfato de dextrano, reduce la inflamación intestinal y favorece la recuperación del daño a nivel de colon. Además la expresión de determinados genes implicados en la maduración intestinal, principalmente factores de crecimiento y mucinas, que se inhibe como consecuencia del tratamiento con sulfato de dextrano, se normaliza en los animales que consumen oligosacáridos de leche de cabra.

4. En la fracción de caseínas de la leche de cabra se han identificado tres péptidos que se liberan tras una hidrólisis enzimática y que son capaces de atravesar una monocapa de células de colon (Caco-2). Estos péptidos han demostrado su bioactividad, destacando el aumento de la capacidad fagocítica del péptido P3 y la inhibición de la actividad metaloproteasa-3 por parte del péptido P1.

Bibliografía

- Aberg N., Sundell J., Eriksson B., Hesselmar B., Aberg B. *Prevalence of allergic diseases in school children in relation to family history, upper respiratory infections and residential characteristics*. *Allergy*. 1996; 51: 232.
- Akrê J. *Alimentación infantil: bases fisiológicas*. Instituto de Saúde de Sao Paulo. 1994. (Trad. Anna Volochko).
- Almeida J.A.G. *Amamentação: um híbrido natureza-cultura*. Río de Janeiro, Editora Fiocruz, 1999.
- Alles Martine S., Scholtens Petra AMJ, Bindels Jacques G. *Current trends in the composition of infant milk formulas*. *Current Paediatrics*. 2004; 14: 51-63.
- American Academy of Pediatrics (Committee on Nutrition). *Soy Protein-based Formulas: Recommendations for Use in Infant Feeding*.
- Anderson M.E. *Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples*. *Method Enzymol*. 1985; 113: 548-555.
- Anderson J.W., Johnstone B.M., Remley D.T. *Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis*. *Am J Clin Nutr*. 1999; 70 (4): 525-35.
- Araki Y., Andoh A., Tsujikawa T., Fujiyama Y., Bamba T. *Alterations in intestinal microflora, faecal bile acids and short chain fatty acids in dextran sulfate sodium-induced experimental acute colitis in rats*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001; 13: 107-111
- Association for Oficial Analytical Chemists (AOAC). *Official methods of analysis, 13ª edición*. Washington DC. 1980; 777.
- Ballabriga A., Carrascosa A. *Nutrición en la infancia y la adolescencia*. 2ª ed. Ediciones Ergón. Madrid. 2001; pp. 626-627.
- Balmer S.E., Scott PH, Wharton BA. *Diet and faecal flora in the newborn: caseins and whey proteins*. *Arch Dis Child*. 1989; 64: 1678-84.
- Balmer S.E., Scott P.H., Wharton B.A. *Diet and faecal flora in the newborn: casein and whey proteins*. *Arch Dis Child*. 1989; 64: 1678-84.

- Balmer S.E., Wharton B.A. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Arch Dis Child*. 1989, 64: 1672.
- Baro L., Jiménez J., Martínez-Férez A. et al. *Bioactive milk peptides and proteins*. *Ars Pharmaceutica*. 2001; 42: 135-45.
- Berseth C.L. *Minimal enteral feeding*. *Clin Perinatol*. 1994; 22: 195-205.
- Bevilacqua C., Martin P., Chandal C. y col. *Goat's milk of defective κ s1-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to β -lactoglobulin in guinea pigs*. *J. Dairy Res*. 2001; 68: 217-227.
- Bianca-Maria Exl., Fritsché R. *Cow's milk protein allergy and possible means for its prevention*. *Nutrition* 2001; 17: 642-651.
- Bocafogli A., Vicentini L., Camerani A. y col. *Adverse food reactions in patients with grass pollen allergic respiratory disease*. *Ann Allergy*. 1994; 73: 301.
- Bode L., Kunz C., Muhly-Reinholz M., Mayer K., Seeger W., Rudolff S. *Inhibition of monocyte, lymphocyte and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides*. *Thromb Haemost*. 2004; 92(6): 1402-1410.
- Boza J.J., Martínez-Augustin O., Gil A. *Nutricional and antigenic characterization o fan enzymatic whey protein hydrolysate*. *J Agric Food Chem*. 1995; 43: 872-875.
- Boza J., Sanz-Sampelayo M.R. *Nutritional aspects of milk goat*. *Ann.Acad.Cien.Vet. Andalucía Oriental*. 1997; 10:109-39.Codex Alimentarius. Appendix V. *Proposed draft revised standard for infant formula (Codex Stan 72-1981) (At step 3 of procedure)*. Sesión nº 24. Julio 2001.
- Brines R.D., Brock J.H. The effect of trypsin and chymotrypsin on the in vitro antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrums. Unusual resistance of human apolactoferrin to proteolytic digestion. *Biochem Biophys Acta*. 1983, 759: 229-235.
- Buts J.O., De Keyser N., Kolanowski J., Sokal E., Nsegiyumba T. Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine: role of dietary poliamines. *Dig Dis Sci*. 1993; 38: 1091-98.

- Byers T., Graham S., Rzepka T. et al. Lactation and breast cancer: evidence for a negative association in premenopausal women. *Am J Epidemiol.* 1985; 121: 664-674.
- Campana W.M., Baumrucker C.R. *Hormones and growth factors in bovine milk.* En: *Handbook of milk composition.* Jensen, RG. Ed., Academic Press, Nueva York. 1995; pp. 476-494.
- Camuesco D., Gálvez J., Nieto A., Comalada M., Rodríguez-Cabezas M.E., Concha A., Xaus J., Zarzuelo A. *Dietary olive oil supplemented with fish oil rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis.* *J. Nutr.* 2005. In press.
- Cant A., Marsden R.A., Kilshaw P.J. *Egg and cow's milk hypersensitivity in exclusively breast-fed infants with eczema, and detection of egg protein in breast milk.* *BMJ (Clin Res Ed).* 1985; 291: 932-35.
- Carver J.D. *Nucleótidos.* *Anales de Nestlé.* 1996; 54: 99-109.
- Chan S., McCowen K.C., Bistran B. *Medium-chain triglyceride and n-3 polyunsaturated fatty acid-containing emulsions in intravenous nutrition.* *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1998; 1(2): 163-169.
- Chandan R.C., Attaie R., Sahani K.M. *Nutritional aspects of goat milk and its products.* En: *Recent advances in goat production.* 1992. Pre-Conference Proceedings. Vol I, Part II, 399: 420.
- Chandra R.K. *Nutrición y sistema inmune desde la infancia hasta la edad avanzada.* En: *Actualización en Nutrición, Inmunidad e Infección.* Ed. Médica Panamericana. 2004. Chilliard Y. *Caractéristiques biochimiques des lipides du lait de chèvre. Comparaison avec les laits de vache et humain.* En: *Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre.* INRA editions. 1996; pp. 51-65.
- Chandran P., Satthaporn S., Robins A., Eremin O. *Inflammatory bowel disease: dysfunction of GALT and gut bacterial flora (II).* *Surgeon.* 2003; 1(3):125-36. Borch-Johnsen K. Mandrup-Poulsen T., Zachau-Christiansen B., Poner G.,

- Christy M., Kastrup K., Nerup J. *Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus*. Lancet. 1984; 2: 1083-1086.
- Clare A.D., Swaisgood H.E. *Bioactive Milk Peptides : A Prospectus*. J. Dairy Sci. 2000; 83: 1187-1195.
- Conway P.L. *Selection criteria for probiotic microorganisms*. Asia Pacific J. Clin. Nutr. 1996; 5: 10-14.
- Crissinger K.D. *Animal models of necrotizing enterocolitis*. J Pediatr. Gastroenterol. Ntr. 1995; 20: 17-22.
- Czajka-Narins D.M. *Minerals*. En: *Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy*. 9ª edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Mexico D.F. 1988; 123-167.
- Dandrifosse G., Peulen O., El Khefif N., Deloyer P., Dandrifosse A.C., Grandfils C. *Are milk polyamines preventive agents against food allergy?* Proc Nutr Soc. 2000; 59 (1): 81-86.
- Dani C., Biandaioli R., Firmito F.R. *Potencial role of probiotics in the prevention of necrotizing enterocolitis*. En: *Infant Formula: Closer to the Reference*. 2002. Rähä NCR & Rubaltelli FF eds. Nestlé Nutrition Workshop Series. Pediatric Program. Vol. 47. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Do Nascimento MBR, Issler H. *Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns*. Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo. 2003; 58 (1): 49-60.
- Dosch H.M., Karjalainen J., Morkowski J., Martin Jm., Robinson B.H. *Nutritional triggering of IDDM*. Pediatr Adolesc Endocrinol. 1991; 21: 202-217.
- EFSA. *Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission relating to the evaluation of goat's milk protein as a protein source for infant formulae and follow-on formulae*. The EFSA Journal. 2004; 30: 1-5.
- Elson C.O., Sartor R.B., Tennyson G.S., Riddell R.H. *Experimental Models of Inflammatory Bowel Disease*. Gastroenterology. 1995; 109: 1344-1367.

- Elson C.O., Sartor R.B., Tenyson G.S., Riddell R.H. y col. *Experimental Models of Inflammatory Bowel Disease*. *Gastroenterology* 1995; 109: 1344-1367.
- Engfer M.B., Stahl B., Finke B., et al. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 2000, 71: 1589-96.
- Erdman JW Jr, Fordyce EJ. *Soy products and the human diet*. *Am. J. Nutr.* 1989; 49: 725-737.
- European Commission Scientific Committee on Food. *Additional statement on the use of resistant short chain fatty carbohydrates (oligofructosyl-saccharose and oligogalactosyl-lactose) in infant formulae and follow-on formulae*. SCF/CS/NUT/IF/47 Final. 14 Diciembre 2001.
- European Commission Scientific Committee on Food. *Report of the scientific committee on food on the revision of essential requirements of infant formulae and follow-on formulae*. SCF/CS/NUT/IF/65 Final. 18 Mayo 2003.
- Franson G.B., Lonnerdal B. *Iron in human milk*. *J. Pediatr.* 1980; 96: 380-384.
- Fraser W.S., Jill M.N., Hubert K. *Milk and type I diabetes*. *Diabetes Care.* 1996; 19(4): 379-383.
- Garofalo R.P., Goldman A.P. Expression of functional immunomodulatory and anti-inflammatory factors in human milk. *Clin Perinatol.* 1999, 26: 361-377.
- Gill H.S. *Enhancement of natural and acquired immunity by Lactobacillus rhamnosus (HN001), Lactobacillus acidophilus (HN017) and Bifidobacterium lactis (HN019)*. *J Nutr.* 2000; 83: 167-176.
- Gill H.S., Doull F., Rutherford K.J., Cross M.L. *Immunoregulatory peptides in bovine milk*. *Br. J. Nutrition.* 2000; 84, S1: S111-S117.
- Gilliland S.E., Speck M.L. *Antagonistic action of Lactobacillus acidophilus toward intestinal and food borne pathogens in associative cultures*. *J. Food Prot.* 1977; 40: 820-823.

- Gnoth M.J., Rudolff S., Kunz C., Kinne R.K. *Investigations of the in vitro transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique.* J Biol Chem. 2001; 276(37): 34363-34370.
- Goldman A.S. *Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective.* J. Nutr. 2000; 130: 426S-431S.
- Gonzalez-Crussi F., Hsueh W. *Experimental model of ischemic bowel necrosis: the role of platelet-activating factor and endotoxin.* Am J Pathol. 1983; 112: 231-239.
- Grazioso C.F., Werner A.L., Alling D.W. et al. *Antiinflammatory effects of human milk on chemically induced colitis in rats.* Pediatr Res. 1997; 42: 639-643.
- Grzesiak T. *Lait de chèvre, lait d'avenir pour les nourissons.* En : *Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre.* INRA editions. 1996; pp. 127-148.
- Guéguen L. *Le valeur nutritionnelle minérale du lait de chèvre.* En : *Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre.* INRA editions. 1996; pp. 67-80.
- Guersy P.R., Bodanski H., Tornsit E., Aeschilimann J.M. *Effect of 3 doses of fruco-oligosaccharides in infants.* J. Pediatr Gastroenterol Nutr. 2000; 31(2): S252.
- Hahn-Zoric M., Fulconis F., Minoli I. et al. *Antibody response to parenteral and oral vaccines are impaired by conventional and low protein formulas as compared to breast-feeding.* Acta Paediatr Scand. 1990, 79: 1137-1142.
- Hill D.J. *Cow milk allergy in infancy and early childhood.* Clin. Exp. Allergy. 1996; 26: 243.
- Hoffmann P., Reinshagen M., Zeeh J.H., Lakshmanan J., Wu V.S., Goebell H., Greken G., Eysselein V.E.. *Increased expression of epidermal growth factor receptor in an experimental model of colitis in rats.* Scand J. Gastroenterol. 2000; 35(11): 1174-1180.
- Host A., Husby S., Osterballe O. *A prospective study of cow's milk allergy in exclusively breastfed infants. Incidence, pathogenic role of early inadvertent exposure to cow's milk formula, and characterization of bovine milk protein in human milk.* Acta Pediatr. Scand. 1988; 77: 663.

- Hoyos A.B. *Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium infantis to neonates in an intensive care unit.* Int. J. Infect. Dis. 1999; 3: 197-202.
- Hutchens T.W., Henry J.F., Yip T.T. *Origin of intact lactoferrin and its DNA-binding fragments found in the urine of human-milk preterm infants. Evaluation by stable isotopic enrichment.* Pediatr. Res. 1991, 29: 243-250.
- Isolauri E. *The role of probiotics in paediatrics.* Current Paediatrics. 2004; 14: 104-109.
- Kalliomäki M., Salminen S., Arvilommi H. et al. *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial.* Lancet. 2001, 31: 1531-1535.
- Kjellman N-IM, Nilsson L. *From food allergy and atopic dermatitis to respiratory allergy.* Pediatr. Allergy Immunol. 1998; 9: 13.
- Klenoff-Brumberg H.L., Genen L.H. *High versus low medium chain triglyceride content of formula for promoting short term growth of preterm infants.* Cochrane Database Syst Rev. 2003; (1): CD002777.
- Koletzko B., Rodriguez-Palmero M. *Polyunsaturated fatty acids in human milk and their role in early infant development.* J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1999; 4(3): 269-84.
- Kosloske A.M. *Epidemiology of necrotizing enterocolitis.* Acta Paediatr. 1994; 396: S2-7.
- Krawisz J.E., Sharon P., Stenson W.F. *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models.* Gastroenterology. 1984; 87: 1344-1350.
- Kritz-Silverstein D., Barrett-Connor E., Hollenbach K.A. *Pregnancy and lactation as determinants of bone mineral density in postmenopausal women.* Am. J. Epidemiol. 1992, 136: 1052-59.
- Kunz C., Rodriguez -Palmero M., Koletzko B. et al. *Nutritional and biochemical properties of human milk, part I: general aspects, proteins and carbohydrates.* Clin. Perinatol. 1999; 26: 307-333.

- Kunz C., Rudolff S., Baier W. et al. *Oligosaccharides in human milk: structural, functional and metabolic aspects*. Annu. Rev. Nutr. 2000, 20: 699-722.
- Jaubert A. Les vitamines et les nucléotides du lait de chèvre. En : Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre. INRA editions. 1996; pp. 81-92.
- Jolles P., Levy-Toledano S., Fiat A.M. et al. *Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from κ -casein on platelet function*. Eur. J. Biochem. 1986, 158: 379-382.
- Lanhendries J.P., Detry J., Van Hees J. y col. Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacterias on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 1995; 21 (2): 177-181.
- Laroia S., Martin J.H. *Bifidobacteria as possible dietary adjuncts in cultured dairy products: A review*. Cult. Dairy Prod. K. 1990, 25: 18-22.
- Lawrence P.B. *Breast milk: best source of nutrition for term and preterm infants*. Ped. Clin. North Am. 1994, 41: 925-941.
- Liepke C., Zucht H.D., Forssmann W.G., Ständker L. *Purification of novel peptides from human milk*. J. Chromatography. 2001; 752: 369-377.
- Lisbona F., Alférez M.J., Barrionuevo I. y col. *Effect of dietary fat and cholecalciferol on magnesium absorption in rats with intestinal resection*. Int. J. Vit. Nutr. Res. 1994; 64: 135-143.
- Lonnerdal B. *Lactoferrina*. Anales Nestlé. 1997, 54: 89-98.
- López-Aliaga I., Alférez J.M., Barrionuevo F. y col. *Influence of goat and cow milk on the digestive and metabolic utilization of calcium and iron*. J Physiol Biochem. 2000; 56: 201-208.
- López-Aliaga I., Alferez M.J.M., Barrionuevo M. y col. *Study of nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection of the distal small intestine. Beneficial effect of goat milk*. J. Dairy Sci. 2003; 86: 2958-2966.
- Lucas A., Cole T.J. *Breast milk and neonatal enterocolitis*. Lancet. 1990; 336: 1519-1523.

- Lukacs N.W., Streiter R.M., Chonsue S.W. y col. *Interleukin-4 dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma*. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1994; 26: 289-296.
- Malosse D., Perron H., Sasco A., Seigneurin J.M. *Correlation between milk and dairy product consumption and multiple sclerosis prevalence: a worldwide study*. Neuroepidemiology. 1992; 11: 304-3012.
- Malven P.V., Head H.H., Collier R.J. y col. *Periparturient changes in secretion and mammary uptake of insulin and in concentrations of insulin and insulin-like growth factors in milk of dairy goats*. J. Dairy Sci. 1987; 70: 2254-2265.
- Marcheti E. *Metal complexes of bovine lactoferrin inhibit in vitro replication of Herpes simplex virus type 1 and 2*. Biometals. 1998, 11: 89-94.
- Marfan A.B. En : *Traité de l'allaitement*. París.1903 ; 468, pp. 470-471.
- Martin P. *La composition protéique du lait de chèvre : ses particularités*. En :Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre. INRA editions. 1996 ; pp. 27-49.
- Martín R., Langa S., Reviriego C. et al. *Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut*. J. Pediatr. 2003; 143 (6): 754-758.
- Martin J., White I.N.H. *Fluorimetric determination of oxidised and reduced glutathione in cells and tissues by high-performance liquid chromatography following derivatization with dansyl chloride*. J Chromatogr B Biomed Appl. 1991; 568: 219-225.
- Martínez-Férez A. *Obtención de oligosacáridos de leche de diferentes especies por tecnología de membranas*. 2004. Tesis Doctoral.
- Matsuaira P. A. *Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*. Academic Press. 1993.
- Mc Veagh P., Miller J.B. *Human milk oligosaccharides: only the breast*. J. Pediatr. Child. Heath. 1997; 33: 281-86.

- Mercier S., Breuillé D., Mosoni L., Obled C. *Chronic Inflammation Alters Protein Metabolism in Several Organs of Adult Rats*. J. Nutr. 2002; 132 (7): 1921-1928.
- Moro G., Minoli I., Mosca M. y col. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula fed term infants. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2002; 34(4): 477.
- Moro G.E., Warm A., Arslanoglu S., Miniello V. *Management of bovine protein allergy: ew perspectives and nutritional aspects*. Ann Allergy Asthma Immunol. 2002; 89(6 Suppl): 91-96.
- Migliore-Samour D., Floc'h F., Jollès P. *Biologically active peptides implicated in immunomodulation*. J Dairy Res. 1989; 56: 357-362.
- Morris G.P., Beck P.L., Herridge M.S., Depew W.T., Szewczuk M.R., Wallace J.L. *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. Gastroenterology. 1989; 96: 795-803.
- Mortensen P.B., Clausen M.R. *Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease*. Scand. J. Gastroenterol. 1996; 31: 123S-148S.
- Naidu A.S., Arnold R.R. *Influence of lactoferrin on host-microbe interactions*. En: Hutchens TW, Lonnerdal B. (eds). Lactoferrin: interaction and biological composition, Humana Press, pp. 259-275.
- Nascimento M.B.R. *Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns*. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo. 2003; 58(1): 49-60.
- Newburg S.N., Neubauer S.H. *Carbohydrates in milk: analysis, quantities and significance*. En: Jensen, RG (ed). Handbook in milk composition, Academic press, New York, pp. 273-350.
- Odle J. *New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by the neonate: observations from a piglet model*. J. Nutr. 1997; 127: 1061-67.

- Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Okusha T., Inagaki Y., Nakaya R. *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. *Gastroenterology*. 1990; 98: 694-702.
- Osman N., Adawi D., Ahrne S., Jeppsson B., Molin G. *Modulation of the effect of DSS-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of Lactobacillus and Bifidobacterium*. *Dig. Dis. Sci.* 2004; 49 (2): 320-327.
- Ozbas Z.Y., Aytac S.A. *Behaviour of Yersinia enterocolitica and Aeromonas hydrophila in yogurt made with probiotic bacteria Bifidobacterium infantis and Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*. 1995, 50: 626-629.
- Paul W.E. *Fundamental Immunology*. 4^a ed. Ed. Lippincott-Raven (Nueva York). 1999; 1: 1-18.
- Pender S.L., Braegger C., Gunther U., Monteleone G., Meuli M., Schuppan D., Macdonald T.T. *Matrix Metalloproteinases in Necrotizing Enterocolitis*. *Pediatr. Res.* 2003; 54: 160-164.
- Pender S.L., Braegger C., Gunther U., Monteleone G., Meuli M., Schuppan D., Macdonald T.T. *Matrix metalloproteinases in necrotising enterocolitis*. *Pediatr Res.* 2003; 54: 160-164.
- Perán Perán L., Camuesco D., Comalada M., Nieto A., Concha A., Díaz-Ropero M.P., Olivares M., Xaus J., Gálvez J. *Preventive effects of a probiotic Lactobacillus salivarius ssp. Sallivarius in the TNBS model of rat colitis*. *World J. Gasroenterol.* 2005. In press.
- Pickering L.K., Granoff D.M., Erickson J.R., Masor M.L., Cordle C.T., Schaller J.P., Winship T.R., Paule C.L., Hilty M.D. *Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing nucleotides*. *Pediatrics*. 1998; 101: 242-249.
- Ploszaj T., Ryniewicz Z., Motyl T. *Polyamines in Goat's Colostrum and Milk*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; 118B (1): 45-52.

- Poulsen O.M., Hau H., Kollerup J. *Effect of homogenization and pasteurization on the allergenicity of bovine milk analyzed by a murine anaphylactic shock model*. Clin. Allergy. 1987; 17: 449-458.
- Precioso R.A., Mascaretti R.M.P. *Necrotizing enterocolitis, pathogenesis and the protector effect of prenatal corticosteroids*. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo. 2002; 57(5): 243-248.
- Real Decreto 72/1998 de 23 de Enero. Regulación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y preparados de continuación.
- Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. *AIN-93, purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. J. Nutr. 1995; 123: 1939-1951.
- Reid G., Jass J., Sebulsky M.T., McCormick J.K. *Potential uses of probióticas in clinical practice*. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(4): 658-672.
- Reinert P. *Le lait de chèvre à la recherche de nouvelles indications*. Quotidien du médecin. 1988 ; 3993,9.
- Report of the Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. *Phytoestrogens and health*. 2003.
- Restani P., Gaiaschi A., Plebani A., Beretta B., Cavagni G., Fiocchi A., Poisei C., Velona T., Ugazio A.G., Galii C.L. *Cross-reactivity between milk from different animal species*. Clin. Exp. Allergy. 1999; 29: 997-1004.
- Riordan J. *The biologic specificity of breast milk*. In: Riordan J, Auerbach KG. *Breastfeeding and human lactation*. 2.ed. Boston, Jones and Barlett Publisher. 1998, pp.121-161.
- Rivero M., Riba M., Vila LI. *Nuevo manual de dietética y nutrición*. 2003. Ed. AMV, Madrid.
- Rodríguez-Cabezas M.E., Gálvez J., Lorente M.D. y col. *Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor- α in TNBS-induced colitis rats*. J. Nutr. 2002; 132: 3263-3271.

- Rodriguez-Palmero M., Koletzco B., Kunz C. et al. *Nutricional and biochemical properties of human milk, part III: lipids, micronutrients and bioactive factors*. Clin. Perinatol. 1999; 26: 335-359.
- Rubaltelli F.F., Dani C., Reali M.F. y col. *Acute neonatal respiratory distress in Italy: a one year prospective study*. Acta Pediatr. 1998; 87: 1261-1268.
- Sambrook J., Maniatis T. y Fritsh E.F. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2º Ed. Cold Sauerwald T.U., Hachey D.L., Jensen C.L., Chen H., Anderson R.E, Heird W.C. *Intermediates in endogenous synthesis of C22:6 omega 3 and C20:4 omega 6 by term and preterm infants*. Pediatr Res. 1997; 41 (2): 183-187.
- Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- Sanchez de Medina F., Martinez-Augustin O., Gonzalez R., Ballester I., Nieto A., Galvez J., Zarzuelo A. *Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease*. Biochem. Pharmacol. 2004. 15; 68(12): 2317-26.
- Schlimme E., Meisel H. *Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects*. Die Nahrung. 1995; 39: 1-20.
- SCF, *Report of the Scientific Comitée on Food on the revision of essential requirements of infant formulae and follow-on formulae* (Opinión expresada el 4 de Abril de 2003).
- Shanahan F. *Probiotics in inflammatory bowel disease-therapeutic rationale and role*. Adv Drug Deliv Rev. 2004; 56(6): 809-818.
- Sierra S., Lara-Villoslada F., Olivares M., Jiménez J., Boza J., Xaus J. *IL-10 expression is involved in the regulation of the immune response by omega-3 fatty acids*. Nutr. Hosp. 2004; 19: 376-382.
- Snider D.P., Marshall I.S., Perdue M.H, et al. *Production of IgE antibody and allergic sensitization of intestinal and peripheral tissues after oral immunization with protein Ag and cholera toxin*. J. Immunol.1994; 153: 647-657.
- Soler C., Garcia-Manteiga J., Valdes R. *Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation*. FASEB J. 2001; 15: 1979-1988.

- Spisni E., Manica F., Tomasi V. *Involvement of prostanoids in the regulation of angiogenesis by polypeptide growth factors*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1992; 47(2): 111-115.
- St-Onge M.P., Jones P. *Physiological effects of medium chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity*. J. Nutr. 2002; 132: 329-332.
- Stucchi A.F., Shofer S., Leeman S., Mateme O., Beer E., McClung J., Shebani K., Moore F., O'Brien M., Becker J.M. *NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in DSS-induced colitis rats*. Am. J. Physiol. 2000; 279: G1298-G1306.
- Sullivan L.W., Luhby L.A., Streiff L.W. *Studies on the daily requirement for folic acid in infants and the etiology of folate deficiency in goat's milk megaloblastic anemia*. Am. J. Clin. Nutr. 1966; 18: 311.
- Sun S., Winship T., Kuchan M.J. *Dietary ribonucleotides modulate type 1 and type 2 responses against OVA in young BALB/c mice*. J. Nutr 2001; 131 (4): 1165-1170.
- Supuran C.T., Casini A., Scozzafava A. *Protease inhibitors of the sulfonamide type: anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents*. Med Res Rev. 2003;23(5): 535-558.
- Telliez F., Bach V., Leke A., Chardon K., Libert J.P. *Feeding behaviour in neonates whose diet contained medium-chain triacylglycerols: short-term effects on thermoregulation and sleep*. Am J. Clin. Nutr. 2002; 76(5): 1091-5.
- Thomson W.A. *Infant formulas and the use of vegetable proteins*. J. Am. Oil Chem. Soc. 1979; 54: 386-388.
- Van Campen D.R. *Enhancement of iron absorption from ligated segments of rat intestine by histidine, cysteine and lysine. Effects of removing ionizing groups and of stereoisomerism*. J. Nutr. 1973; 103: 139.
- Van Hooijdonk A.C., Kussendrager K.D., Steijns J.M. *In vivo antimicrobial and antiviral activity in bovine milk and colostrums involved in non-specific defence*. Br. J. Nutr. 2000; 84, Suplemento 1: S127-134.

Vandenplas Y. *Oligosaccharides in infant formula*. Br. J. Nutr. 2002; 87, Supplemto2: S293-S296.

Xanthou M. *Immune protection of human milk*. Biol. Neonate. 1998; 74: 121-133.

Xiu-min Li, Brian H. Scholfield, Ching-Kang Huang y col. *A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity*. J. Allergy Clin. Immunol. 1999; 103: 206-214.

Yellayi S., Zakroczymski M.A., Selvaraj V., Valli V.E., Ghanta V., Helferich W.G., Cooke P.S. *The phytoestrogen genistein suppresses cell-mediated immunity in mice*. J Endocrinol. 2003; 176(2): 267-274.

Anexo

Curriculum vitae

Federico Lara Villoslada nació en Granada (1976) y se licenció en Farmacia por la Universidad de Granada en el año 1999. Le fueron concedidos el Premio Extraordinario Fin de Carrera otorgado por la Asociación de Antiguos Alumnos de la Facultad de Farmacia de Granada en el año 1999 y el Primer Premio Nacional de Fin de Carrera concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia, en el año 2000.

Durante los años 2000 y 2001 trabajó como investigador predoctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular bajo la dirección de la Dra.M^a Dolores Suárez Ortega y becado por el Ministerio de Educación y Ciencia. En Septiembre de 2001 se incorporó al Departamento de Biomedicina de Puleva Biotech, donde comenzó la Tesis Doctoral que se recoge en la presente Memoria, bajo la dirección del Dr.Jordi Xaus Pey y la Dra. Mónica Olivares Martín y becado por la Fundación Empresa-Universidad de Granada. Obtuvo el Diploma de Estudios Avanzados en el año 2002 mediante un trabajo titulado “Efecto inmunosupresor de los ácidos grasos de la serie ω 3 en ratones”.

Publicaciones

1. Sierra S, **Lara Villoslada F**, Olivares M, Jiménez J, Boza J, Xaus J. IL-10 expression is involved in the regulation of immune response by ω 3 fatty acids. *Nutrition*. 2003; 19 (11-12), 1059.
2. **Lara-Villoslada, F.**; Olivares,M.; Boza,J.;Jiménez, J.; Xaus,J. Atopia a la proteína de la leche de cabra: una alternativa válida. *Allergologia et Immunopathologia*. 2003; (31) 3,175.
3. **Lara-Villoslada F**, Olivares M, Jimenez J, Boza J, Xaus J. Goat Milk is less immunogenic than Cow Milk in a murine model of atopy. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2004. Oct;39(4):354-360.
4. Sierra S, **Lara-Villoslada F**, Olivares M, Jimenez J, Boza J, Xaus J. IL-10 expression is involved in the regulation of the immune response by omega-3 fatty acids. *Nutrición Hospitalaria*. 2004. 19:364:370.

5. Sierra S, **Lara-Villoslada F**, Olivares M, López-Huertas E, Xaus, J. Effects of Rice Bran Oil on the immune response. *Clinical Nutrition*. 2004; 23 (4), 933-934.

6. Sierra S, **Lara-Villoslada F**, Olivares M, Jimenez J, Boza J, Xaus J. Increased immune response in mice consuming rice bran oil. *European Journal of Nutrition*. 2005 (publicado on-line el 22 de Febrero).

7. **Lara-Villoslada F**, Olivares M, Xaus J. The Balance between Caseins and Whey Proteins in cow's milk determines its Allergenicity. *Journal of Dairy Science*. (In press).

8. Sierra S, **Lara-Villoslada F**, Comalada M, Olivares M, Xaus J. Antiinflammatory effects of dietary fish oil may be mediated through an increase in IL-10. (Sometido y pendiente de publicación).

9. **Lara-Villoslada F**, Debras E, Gálvez J, Nieto A, Concha A, Boza J, Xaus J, Obled C. Oligosaccharides and growth factors from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of DSS-induced colitis. (Sometido y pendiente de publicación).

10. Olivares M, Diaz-Ropero MP, Gomez N, **Lara-Villoslada F**, Sierra S, Maldonado JA, Martin R, Lopez-Huertas E, Rodriguez JM, Xaus J. Combined effects of *Lactobacillus gassery* CECT5714, a breast milk strain, and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 on healthy humans. (Sometido y pendiente de publicación).

Comunicaciones a congresos

Posters

1. Martínez-Augustin, O.;Puerta, V.; **Lara, F**; Girón, MD; Salto, R; Suárez, M.D. Clonaje de la linoleil Co-A desaturasa de rata y expresión en hepatomas humanos (Hep-G2).XXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular(SEBBM).Granada 2000.

2. **Lara-Villoslada, F**; Martínez-Augustin, O.; Girón, MD; Salto, R; Suárez, M.D. Regulación del metabolismo lipídico producida por la sobreexpresión de la linoleil-CoA desaturasa de rata en células Hep-G2. XXIV Congreso de la SEBMM. Valencia 2001.

3. **Lara-Villoslada, F**; Olivares, M.; Boza, J.; Jiménez, J.; Xaus, J. Atopia a la proteína de la leche de cabra: una alternativa válida. XXVII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología Clínica y Alergología Pediátrica (SEICAP).

4. Sierra S, **Lara Villoslada F**, Olivares M, Jiménez J, Boza J, Xaus J. IL-10 expression is involved in the regulation of immune response by ω 3 fatty acids. IX Congreso de la Sociedad Española de Nutrición. Tenerife 2003.

5. Sierra S, **Lara-Villoslada F**, Olivares M, López-Huertas E, Xaus, J. Effects of Rice Bran Oil on the immune response. 26th ESPEN Congress. Lisboa 2004.

Comunicaciones orales

6. **Lara-Villoslada F**, Olivares M, Boza J, Jiménez J, Xaus J. Efecto inmunosupresor de una dieta rica en ácidos grasos de la serie ω 3 en ratones. XXV Congreso de la SEBBM. León 2002.

