



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Farmacia

TESIS DOCTORAL

**Caracterización de la leche de cabra frente a la de vaca.
Estudio de su valor nutritivo e inmunológico**

LAURA SANZ CEBALLOS

Granada, julio 2007

Esta Memoria de Tesis Doctoral forma parte del proyecto: “Caracterización de la leche de cabra frente a la de vaca. Estudio de su valor nutritivo, inmunológico y tecnológico.”
(Junta de Andalucía: C03-045)



D^a M^a Remedios Sanz Sampelayo, Profesora de Investigación de la Unidad de Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Granada.

D^a Matilde Rodríguez Osorio, Investigadora Científica de la Unidad de Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Granada.

INFORMAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral:

**“Caracterización de la leche de cabra frente a la de vaca.
Estudio de su valor nutritivo e inmunológico”**

han sido realizados bajo nuestra dirección por la licenciada Laura Sanz Ceballos, en la Unidad de Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Granada, y corresponden fielmente a los resultados obtenidos. La encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Granada.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente informe en Granada, a diez de julio del dos mil siete.



**MEMORIA QUE PRESENTA LA LDA. LAURA SANZ CEBALLOS PARA ASPIRAR AL
GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

ESTA TESIS HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Prof. Dra. D^a M^a Remedios Sanz Sampelayo

Dra. D^a Matilde Rodríguez Osorio

Lda. D^a Laura Sanz Ceballos

Granada, julio 2007

AGRADECIMIENTOS

Al terminar la redacción de esta Tesis Doctoral quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas y cada una de las personas, sin cuya ayuda, la misma, no se hubiera realizado y llevado a buen fin.

En primer lugar, a la Dra. M^a Remedios Sanz Sampelayo, directora de esta Tesis, para ti no tengo palabras de agradecimiento por todo el esfuerzo, entusiasmo, cariño y consejo que me has dedicado siempre. Gracias por tu ofrecimiento de realizar esta tesis, y reavivarme así mi incipiente interés investigador desde el primer momento en que empezamos este trabajo. No pensé que esta tarea pudiera “engancharme” tanto. ¡Es tan fácil trabajar y aprender contigo que parece que fue ayer cuando empezamos...! Esto te lo debo a ti por ser una magnífica profesional y “una buenísima persona”. Me has hecho crecer en el terreno investigador pero sobre todo, en el personal. ¡Nunca podré corresponderte a tanta entrega, confianza y entusiasmo hacia a mi!

A la Dra. Matilde Rodríguez Osorio, mi otra directora, por tu buen hacer y exquisito trato, tu constancia y dedicación, pero sobre todo por tu cariño y ayuda durante el desarrollo de esta tesis. Con tu tesón has conseguido que la inmunología, asignatura que no me llamó la atención en la facultad, hoy al haberla vivido tantas horas en el laboratorio contigo, me atraiga mucho más y haya aprendido que en la ciencia al igual que en la vida, la paciencia es una virtud.

A Francisca Gil Extremera, porque me has dejado una gran huella por tu competencia, forma de trabajar y minuciosidad en toda la fase experimental y analítica. Quiero agradecerte tu personalidad arrolladora, generosa y entusiasta en tu trato conmigo y tu forma de superar todos los problemas que se iban produciendo en el laboratorio y en la transcripción de la tesis. Gracias por todo Paqui, hoy te conozco y valoro muchísimo más.

A la Dra. Victoria Gómez García, por tus consejos y por brindarme tu gran experiencia en el campo de la Inmunología.

Al Dr. Luís Lara Escribano, por ser un “manitas” con los ordenadores y por el apoyo y trabajo desarrollado en las cuestiones fotográficas e informáticas. Gracias por tu paciencia y consejos.

A Vicente Agustín Vacas, por contar con tus especiales dotes en el manejo y extracción de muestras biológicas de los animales de determinados ensayos. Gracias por tu ayuda desinteresada.

A los Dres. Rosa Nieto Liñán e Ignacio Fernández Fígares, por vuestra colaboración en la determinación del perfil aminoacídico de los dos tipos de leche objeto de este estudio.

A todos los miembros del Departamento de Nutrición Animal, de la Estación Experimental del Zaidín, (personal investigador, becarios, técnicos, personal laboral y de seguridad) que siempre me han brindado todo su apoyo y cariño.

A la Dra. Margarita Sánchez Campos, que desde mis primeros pasos en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de Granada, y después siendo mi tutora en el “Período de Investigación Tutelada”, lograste inculcarme el afán por la investigación, por el trabajo bien hecho y por el laboratorio. Gracias por tu gran ayuda, entonces y ahora, en toda esta tarea, al poner a mi disposición tus años de experiencia, tu saber y tu buen hacer, pero sobre todo tu gran humanidad.

A la Dra. M^a José Lupiani Torres, mi tutora en el “Período de Docencia” del doctorado, quiero agradecerte tu capacidad de trabajo y “ese genio alegre tuyo”, que me ha animado en todo momento desde el comienzo de mi carrera. También la cercanía, afecto y cariño con que me he sentido tratada en todo momento.

Al Dr. Javier Díaz Castro, por tu gran pericia en el manejo del diseño gráfico. Gracias por tus ideas y ayuda. Es gratificante encontrar personas siempre dispuestas a ayudar a los demás.

Al Departamento de Producción Animal de la ETSIAYM de la Universidad de Córdoba, (en especial a Paquita), por la determinación de las fracciones proteínicas de las muestras de leche empleadas.

A todos mis amigos a los que en algún momento he descuidado debido al trabajo de esta tesis. Que sepáis que nunca os olvidé y que siempre sentí vuestra cercanía y comprensión. Parte de todo esto también es vuestro.

A mis padres, hermana y demás familiares que siempre han estado pendientes de mí, dándome su cariño, ofreciéndome su colaboración en todo, aconsejándome, estimulándome. Sé que el final de esta etapa es para vosotros tan gratificante como lo es para mí ¡A vosotros os lo debo! ¡Disfrutémoslo!

“Descubrí, aunque inconsciente e insensiblemente, que el placer de observar y razonar era mayor que el que reside en tantas otras cosas...”

Charles Darwin

A mis padres, por todo su cariño y porque gracias a su ejemplo, he llegado a ser lo que soy hoy

A mi hermana, a mi “chiquitilla”, por dejarme que sea una segunda “mamá” para ella

A mi tía.

1.- INTRODUCCIÓN - OBJETIVOS	3
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1.- Importancia de la ganadería caprina en nuestro país	13
2.2.- La leche como alimento	18
2.2.1.- Características de composición específica de la leche de cabra	19
2.3.- Estudios realizados con el fin de determinar el valor nutritivo de la leche de cabra	25
2.3.1.- Valor nutritivo de la leche de cabra en función de su composición específica. Utilización de su proteína y grasa	28
2.4.- Metabolismo particular de los MCT. Aspectos de mayor interés	30
2.5.- Valoración de la calidad de una proteína. Importancia del aporte energético	33
2.6.- Bioenergética – Termogénesis	36
2.7.- Alergia a las proteína de la leche	37
2.7.1.- Alergia a la proteína de la leche de vaca	40
2.7.2.- Proteínas lácteas con poder antigénico	44
2.7.3.- Síntomas de una alergia alimentaria	46
2.7.4.- Alternativas al consumo de leche de vaca en los casos de alergia a su proteína	47
2.7.5.- La leche de cabra como posible alternativa en los casos de alergia a la de vaca	50
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1.- Estudio del valor nutritivo de la leche de cabra y vaca. Utilización de su proteína y energía	59
3.1.1.- Animales y dietas	59
3.1.2.- Metodica de los ensayos	64
3.1.3.- Medidas y análisis	65
3.1.4.- Parámetros obtenidos o estimados	67

3.1.5.- Tratamiento estadístico de resultados	68
3.2.- Estudio comparativo de la capacidad inmunógena de la leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros	69
3.2.1.- Determinación del espectro antigénico de la leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros	69
3.2.2.- Análisis de la capacidad alergénica de leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros: Ensayos <i>in vivo</i>	75
3.2.3.- Determinación de la reactividad cruzada entre los componentes de leche de cabra, leche de vaca, lactosuero de cabra y lactosuero de vaca: Ensayos <i>in vitro</i>	79
3.2.4.- Tratamiento estadístico de resultados	82
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
4.1.- Valor nutritivo de la leche de cabra y vaca. Utilización de su proteína y energía	85
4.1.1.- Composición aminoacídica y en distintas fracciones de la proteína de la leche desnatada de cabra y vaca	85
4.1.2.- Perfil en ácidos grasos de las grasas	88
4.1.3.- Composición mineral de la leche desnatada de cabra y vaca	90
4.1.4.- Composición vitamínica de la leche desnatada de cabra y vaca y grasas de leche de cabra y vaca	91
4.1.5.- Ingesta de alimento, coeficientes de eficacia en crecimiento e índices de transformación del alimento, según dieta consumida ...	92
4.1.6.- Coeficientes de digestibilidad de la materia seca, materia orgánica, proteína, grasa, minerales y energía de las dietas experimentales	95
4.1.7.- Contenidos en energía digestible y metabolizable de las dietas experimentales.....	101
4.1.8.- Valores de ingesta, excreción y balances de N según dieta consumida	103
4.1.9.- Valores de ingesta, excreción y retención de energía según dieta consumida	108
4.1.10.- Pesos vivos finales alcanzados y composición química de los mismos	113

4.2.- Estudio comparativo de la capacidad inmunógena de la leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros	115
4.2.1.- Determinación del espectro antigénico de la leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros	115
4.2.2.- Análisis de la capacidad alérgica de leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros: Ensayos <i>in vivo</i>	121
4.2.3.- Determinación de la reactividad cruzada entre las proteínas de leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros: Ensayos <i>in vitro</i>	139
4.3.- Interacción entre la composición y/o utilización nutritiva de la leche de cabra y vaca y su capacidad inmunógena	162
5.- RESUMEN Y CONCLUSIONES	165
6.- BIBLIOGRAFÍA	169

ABREVIATURAS

Anti IgG (H+L)	Anti-Inmunoglobulina de conejo de clase IgG, cadenas pesadas y ligeras
CEC	Coeficiente de eficacia en crecimiento
CLA	Ácido linoléico conjugado
CN	Caseína
DO	Densidad óptica
ELISA	Técnica inmunoenzimática
Ig	Inmunoglobulina
ID	Inmunodifusión
IT	Índice de transformación
LC	Leche de cabra
LCT	Triglicéridos de cadena larga
LLC	Lactosuero de leche de cabra
LLV	Lactosuero de leche de vaca
LV	Leche de vaca
MCT	Triglicéridos de cadena media
MO	Materia orgánica
MS	Materia seca
PBS	Tampón fosfato
PBS-T	Tampón fosfato-Tween 20
PCA	Prueba de anafilaxia cutánea pasiva
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico
S₀	Sangría cero

1.- INTRODUCCIÓN - OBJETIVOS

1.- INTRODUCCIÓN - OBJETIVOS

La leche de las distintas especies de rumiantes, bien directamente o en forma de productos derivados, constituye un alimento de singular importancia para el ser humano durante toda su vida. Este alimento puede considerarse fuente de macro y micronutrientes, conteniendo además, un cierto número de compuestos activos, que juegan un importante papel tanto nutritivo, como de protección. Ya sea para su consumo directo o en forma de productos derivados, la leche de vaca es la más empleada en todo el mundo occidental, en razón especialmente, de su mayor disponibilidad.

Junto a esto, es bien conocido que la calidad de un alimento, se considera hoy dependiente no sólo del potencial del mismo para satisfacer las necesidades nutritivas del consumidor, sino también de su posible contribución en el mantenimiento de un estado de buena salud. En este sentido, la leche de cabra así como los productos derivados de ella, se vienen considerando últimamente, de acuerdo con su composición específica, de un gran interés dentro de la nueva tendencia por consumir alimentos de una alta calidad, tanto nutritiva como saludable.

En cuanto a la calidad nutritiva que la leche de cabra presenta frente a la de vaca, desde hace tiempo se viene indicando, que el valor tanto de su proteína como de su grasa podría resultar mejor, de acuerdo con su utilización tanto a nivel digestivo como metabólico. Los resultados disponibles al respecto, se refieren a estudios realizados en niños malnutridos (Razafindrakoto y col., 1993), o que sufrían síndrome de malabsorción (Hachelaf y col., 1993), así como también, a los obtenidos en distintos modelos experimentales (Février y col., 1993, 2000; Alférez y col., 2001; López Aliaga y col., 2003). En el primer caso, el mejor valor nutritivo de la leche de cabra frente a la de vaca, se deduce analizando la recuperación y el crecimiento de los niños según tipo de leche consumida. De los ensayos realizados a nivel experimental, en los que se empleaban dietas constituidas sólo en parte, por leche de cabra o vaca, se establece la mejor utilización que a nivel digestivo, tanto la grasa (Alférez y col., 2001) como la proteína de la leche de cabra, era capaz de alcanzar frente a la de vaca (López

Aliaga y col., 2003). Al mismo tiempo, de estos estudios se derivan otros resultados indicativos de la mejor utilización que a nivel metabólico, la proteína de este mismo tipo de leche podría conseguir, aspecto éste que se justifica tanto en base a la distinta composición en fracciones que la proteína de ambos tipos de leche presenta, como también, en base a la diferente disponibilidad energética que para la utilización proteica puede originarse en razón de la distinta composición de la grasa que, igualmente, las dos clases de leche presentan (López Aliaga y col., 2003).

En efecto, la leche de cabra presenta normalmente, una proporción algo menor de caseínas, resultando en consecuencia más alta la cantidad de proteínas séricas más solubles, aspecto que podría determinar un más alto aprovechamiento a nivel digestivo (Boza y Sanz Sampelayo, 1997; López Aliaga y col., 2003). Además dentro de los distintos tipos de caseínas, la leche de cabra alcanza niveles sensiblemente más bajos de α_{S1} -caseína, lo que determina que a nivel del estómago, durante la acidificación, se forme un coágulo más blando y desmoronable, lo que facilita la acción de las proteasas a ese nivel, así como, posteriormente en el intestino, resultando más rápida y eficiente la digestibilidad de sus caseínas (Chandan y col., 1968; Devendra y col., 1970; Park, 1994, 2006). Este distinto comportamiento de acuerdo con su composición en fracciones proteínicas, resulta en opinión de Haenlein (2004), sólo un reflejo de lo que a nivel aminoacídico, los dos tipos de leche, igualmente muestran, ya que las distintas fracciones se originan en razón de la composición de las correspondientes cadenas polipeptídicas, en las que esencialmente, unos aminoácidos se sustituyen por otros.

Independientemente de la distinta naturaleza de su proteína, la principal diferencia existente entre la composición de la leche de cabra y vaca, es la que se refiere a la existente entre sus grasas. Junto al menor tamaño de los glóbulos que la forman (Jenness, 1980), aspecto al que se le atribuye desde hace tiempo su mayor digestibilidad, la leche de cabra presenta una grasa, cuyo contenido en los llamados triglicéridos de cadena media (MCT), triglicéridos formados por ácidos grasos cuya cadena carbonada tiene entre 4 y 14 átomos de carbono, alcanzan normalmente, un porcentaje mayor del 30%, a diferencia de la leche de

vaca que no presenta de estos compuestos, más del 20%. Es por esto por lo que los ácidos grasos caproico (C6:0), caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0), toman su nombre concretamente de la leche en donde mayoritariamente aparecen, alcanzando estos tres ácidos grasos en la leche de cabra, un 15%, valor que solo llega al 5% en la de vaca (Boza y Sanz Sampelayo, 1997; Haenlein, 2004). Los MCT se caracterizan por seguir una vía de utilización metabólica distinta de la seguida por los triglicéridos constituidos por ácidos grasos de cadena larga (LCT). Los ácidos grasos originados en la hidrólisis de los MCT, son capaces de ser absorbidos sin reesterificación en las células intestinales, entrando directamente en la vena Porta. Su bajo peso molecular y su hidrosolubilidad, facilita la acción de los enzimas digestivos, haciendo que la hidrólisis sea más rápida y completa que la de los LCT y, a diferencia de la de éstos, la digestión de los MCT comienza a producirse en el estómago, ya que la lipasa gástrica, prácticamente sin acción sobre los LCT, inicia la hidrólisis de los MCT, la que será completada por la lipasa pancreática a un ritmo cinco veces superior a la hidrólisis de los LCT (Haenlein, 1992, 1996; García Unciti, 1996; Boza y Sanz Sampelayo, 1997). A esta digestión le sigue un rápido catabolismo oxidativo, ya que los ácidos grasos de cadena corta y media, una vez absorbidos, son por el sistema porte, llevados al hígado y otros tejidos periféricos. Matsuo y Takeuchi (2004) informan de cómo los MCT presentan un destino metabólico distinto, lo que puede dar lugar a las diferencias que estos compuestos originan a nivel de la termogénesis postprandial. Los ácidos grasos contenidos en los MCT penetran en la mitocondria de las células hepáticas, independientemente de la acil-CoA-carnitina transferasa (Velázquez y col., 1996; Matsuo y Takauchi, 2004). Finalmente, estos ácidos grasos son oxidados originando una rápida descarga de energía que puede ser utilizada en distintos procesos metabólicos, como puede ser el de mantenimiento o el de la síntesis proteica. En opinión de los autores citados (Matsuo y Takauchi, 2004), esta mayor capacidad oxidativa estaría relacionada con los mecanismos que determinan un menor depósito de grasa bajo ingestas de dietas ricas en MCT.

Sin embargo, a partir de la información disponible hasta el momento, no puede deducirse de manera clara, el quizá mejor valor nutritivo que la leche de cabra puede tener frente a la de

vaca, y mucho menos atribuirle las posibles diferencias que al respecto se señalan. Si el valor nutritivo de un alimento, sobre todo para el crecimiento, reside esencialmente, en la calidad de su proteína, y si en este sentido, la fuente de grasa, en cuanto que en razón de su naturaleza puede procurar la energía necesaria para dicha utilización, esencial resultaría, en primer lugar, el establecer la posible mejor utilización de la proteína de la leche de cabra frente a la de vaca y, en segundo lugar, identificar la colaboración que su grasa podría llegar a tener al respecto.

Junto a la importancia de carácter básico de estas cuestiones, para considerar el interés práctico de las mismas, bastaría tener en cuenta el diferente valor nutritivo que la leche de cabra podría alcanzar, según se tratara de leche entera, semidesnatada o desnatada.

De acuerdo con lo anterior, el primer objetivo de este estudio fue: **Determinar, según la utilización de la proteína y energía, el valor nutritivo de la leche de cabra frente a la de vaca, estableciendo al mismo tiempo, la posible interacción que al respecto, podría existir entre su proteína y grasa.** Para ello y en ratas al destete, se analizó la utilización a nivel tanto digestivo como metabólico, de cuatro dietas diferentes, dietas en las que su proteína procedía de leche de cabra o vaca, sucediendo lo mismo respecto de su grasa, correspondiendo por tanto el diseño de los ensayos, al factorial 2 (fuente de proteína) x 2 (fuente de grasa).

La alergia a las proteínas de la leche de vaca es una enfermedad frecuente en la edad infantil. Como nos indica Park (1994), la mayor parte de los niños menores de tres años, presentan anticuerpos circulantes frente a la proteína de la leche, llegando a mostrar en los países occidentales, el 7% de estos niños, algún síntoma de alergia frente a las proteínas lácteas.

La primera descripción de una alergia a la leche se debe a Hamburger, quien en 1901 detectó una reacción aguda en un niño después de su alimentación con leche bovina. Desde esta fecha hasta hoy, se han realizado numerosos estudios que han llevado al convencimiento de que, en determinadas circunstancias, como en los síndromes de malabsorción, las

proteínas de la leche de vaca pueden producir problemas de hipersensibilidad no sólo en lactantes, sino también en niños y adultos. Como consecuencia de esto, se han llevado a cabo estudios para ofrecer alternativas al uso de esta leche, sobre todo con hidrolizados de la misma que, en cierta medida, reducen la alergenicidad presentando su consumo otros problemas (Boza y col., 1994, 1995a). Otra alternativa que se viene desde siempre señalando a los casos de alergia a las proteínas de la leche de vaca, es su sustitución por la de cabra. A este respecto, en un Informe de la Comisión de la Comunidad Europea de 1991, se aconseja su empleo en niños con riesgo alérgico y en los que sufren hipersensibilidad a las proteínas de la dieta.

La alergia a la leche de cabra ha sido muy raramente señalada (Wuthrich, 1995) y en general, ha sido imputada a la adulteración con leche de vaca. Desde hace tiempo se han venido considerando las ventajas de la leche de cabra, sobre la de vaca, en relación con la alergenicidad de ésta última, así Walker (1965) y Brenneman (1978), han destacado cómo pacientes alérgicos a la leche de vaca toleraban bien la de cabra en un 99 y 40% respectivamente. Más recientemente, Podleski (1992), ha señalado la importancia de la sustitución de la leche de vaca por la de cabra en pacientes con alergia a la primera. Park (1994) en su excelente revisión de este tema, la aconseja debido a su tolerancia en prácticamente el 100% de los pacientes que muestran alergia a la leche de vaca. No obstante a todo esto, de la revisión bibliográfica que hemos realizado, sobresale notablemente la controversia sobre este tema. Entre otros autores Saperstein (1974) y Spuerger y colaboradores (1997), en personas alérgicas a las proteínas de la leche de vaca, desaconsejan el empleo de leche de cabra por su ineficacia en reducir la reacción. Spuerger y colaboradores (1997) llevaron a cabo estudios *in vitro* con sueros de niños alérgicos a la leche de vaca, para determinar la reactividad cruzada entre la leche de vaca y cabra, observando que la IgE e IgG de los sueros reaccionaban con las α -caseínas de ambas leches. Sin embargo esta reactividad cruzada, observada *in vitro*, no significa necesariamente que las α -caseínas de la leche de cabra den origen a una forma clínica de alergia (Park y Haenlein, 2006).

La leche de vaca ha sido estudiada con bastante profundidad, tanto en modelos experimentales de laboratorio como en la clínica, deduciéndose que la α -caseína y sobre todo la β -lactoglobulina, son las proteínas más alergénicas (Pahud y col., 1985; Bahna, 1991; Heyman y Desjeux, 1992). Estudios comparativos sobre la alergenicidad de la leche de cabra y vaca no son muy abundantes. En este sentido, Bevilacqua y colaboradores (2001), empleando como modelo experimental cobayas, sensibilizadas por vía oral, con leche de cabra con un alto contenido en α_{S1} -caseína, frente a otras sensibilizadas con leche de cabra con bajo contenido en dicha fracción, concluyen que en estas últimas disminuyó la sensibilización sistémica intestinal. El título de anticuerpos frente a la anti- β -lactoglobulina de cabra (IgG1) fue significativamente menor que las sensibilizadas con leches con alto contenido en α_{S1} -caseína. Los autores concluyen que las discrepancias existentes en la literatura respecto a la hipoalergenicidad de la leche de cabra frente a la de vaca, son debidos al alto polimorfismo genético de las proteínas de la leche de cabra.

Lara Villoslada y colaboradores (2004) empleando un modelo murino estudian comparativamente la reacción alérgica de la leche de cabra frente a la de vaca, utilizando leche UHT, desnatada, siendo los animales sensibilizados mediante sonda gástrica. Los autores encuentran que los sensibilizados con leche de cabra, presentan significativamente menor número de casos con diarrea, menores niveles de anticuerpos (IgG 1), y más baja sensibilización de los linfocitos. De los resultados se concluye la necesidad de seguir profundizando para clarificar si la leche de cabra puede ser una alternativa para fórmulas en la alimentación infantil.

En la literatura no existe ningún trabajo en el que se estudie, mediante técnicas tanto *in vivo* como *in vitro*, comparativamente la alergenicidad de la leche de cabra y vaca, así como la de sus respectivos lactosueros, y su reactividad cruzada. Lo anteriormente expuesto nos ha llevado a realizar un estudio amplio con técnicas inmunológicas actuales, sensibles y específicas.

En el trabajo desarrollado, el modelo experimental para estudiar la alergenicidad ha sido el cobaya, utilizando leche sin ningún tratamiento, la que era ingerida por los animales, sin ninguna manipulación y restricción. Los ensayos de alergenicidad *in vivo*, los hemos llevado a cabo en cobayas, debido a que este animal es comúnmente usado en los ensayos de hipersensibilidad de tipo I. De hecho, fue inicialmente descrito por Parish y colaboradores (1964), como modelo para estudiar la alergia a las proteínas de la leche de vaca, siendo ampliamente utilizado para realizar los ensayos de alergia en fórmulas dirigidas a la alimentación infantil (McLaughlan y col., 1981; Bevilacqua y col., 2001). Los ensayos *in vitro* se han realizado en el suero de los cobayas sensibilizados por vía oral con las cuatro soluciones antigénicas utilizadas: leche de cabra, leche de vaca, lactosuero de leche de cabra y lactosuero de leche de vaca. Mediante la técnica ELISA, hemos comprobado el desarrollo de anticuerpos y por Western blot, las moléculas diana frente a las que se han producido los anticuerpos. Todas las investigaciones que se señalan en esta Memoria, se han realizado con leche de cabra de raza Granadina y la de vaca de raza Holsten Frisian. De acuerdo con lo indicado, el segundo objetivo general de la presente Memoria, fue: **Estudio comparativo de la capacidad inmunógena de la leche de cabra y vaca y de sus lactosueros**. Para la consecución de este objetivo se abordaron los siguientes apartados o hitos.

Determinación del espectro antigénico de la leche de cabra, vaca y de sus lactosueros

La realización de esta apartado nos permitirá conocer el patrón antigénico, es decir, el número de moléculas antigénicas. Veríamos así mismo, las diferencias existentes entre ellas

Análisis de la capacidad alérgica de la leche de cabra, vaca y de sus lactosueros:

Ensayos *in vivo* e *in vitro*

Con el desarrollo del mismo, constataremos la aparición de reacciones alérgicas, (hipersensibilidad tipo I) y la severidad de las mismas. Determinaremos los valores de anticuerpos específicos e identificaremos los antígenos, frente a los cuales, los anticuerpos están dirigidos.

Determinación de la reactividad cruzada entre los componentes de leche de cabra, vaca, lactosuero de cabra y lactosuero de vaca: Ensayos *in vitro*

Las investigaciones que aquí planteamos, nos permitirán identificar las moléculas con epítomos comunes, responsables de la reactividad cruzada.

Con la realización de lo descrito, estaremos en condiciones de definir la capacidad inmunógena de la leche de cabra frente a la de vaca. Así mismo, se deduciría si la inmunización oral es capaz de estimular al sistema inmune, a un nivel en el que se detecten anticuerpos específicos. De igual forma, se podrá determinar el grado de reactividad cruzada existente entre los patrones antigénicos de las cuatro soluciones inmunizantes.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- Importancia de la ganadería caprina en nuestro país

En España y de acuerdo con el Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo (MOPU) (1982) más del 25% de su superficie (13.034.000 Ha) sufre fenómenos graves de erosión. Entre las zonas áridas destacan casi la totalidad de la provincia de Almería y parte de las de Murcia y Granada, con una superficie de unos 32.622 km², zona considerada como el único desierto europeo (Boza, 1991). Boza (1991) indica cómo, pese a la diversidad de las condiciones físicas, ecológicas, socioeconómicas y políticas, todas las zonas áridas presentan un problema común, la fragilidad en el equilibrio de sus ecosistemas y, en consecuencia, el peligro de desertización, provocado la mayoría de las veces, por la intervención del hombre que siempre abusó de su ambiente vital.

Para la región mediterránea, árida y semiárida, diversos autores han propuesto la alternativa con mejores posibilidades productivas y conservadoras del medio: el uso ganadero, (Boza y col., 1985; Le Houreau, 1989; Montserrat, 1990), mediante sistemas extensivos o semiextensivos, con bajos aportes del exterior, basados en sus propios recursos e integrados en el medio natural, dentro de lo que se entiende por agricultura sostenida, seleccionando a la cabra como especie de elección por su adaptación a estas zonas, y por el alto valor de sus producciones. Al mismo tiempo, este tipo de ganadería de ordeño genera un trabajo continuado a lo largo del año, con lo que se favorece la estabilidad demográfica de estas áreas desfavorecidas (Boza, 1993).

Son numerosos los autores que han señalado que el ganado caprino es el medio más importante para mantener la presencia humana en grandes espacios de la cuenca mediterránea, actividad ganadera, que en opinión de Boza (2005), parece tener las mejores posibilidades económicas y, a la vez, conservadoras del medio. El caprino es un animal suministrador de alimentos de calidad para el hombre (leche y carne de animal joven), de materias primas (leche, pelo, piel), además de abono orgánico para la agricultura de primor, indicándose en la actualidad su interés ecológico como especie estabilizadora de los

ecosistemas, cuando se maneja adecuadamente y con un papel destacado en la selvicultura preventiva, limpiando el monte y evitando, en gran parte, sus incendios.

Raggi y colaboradores (1985) indican cómo la adaptación y habituación han hecho, y siguen haciendo posible, la vida en los distintos ambientes. En relación con esto, es notable que la cabra se considere un animal con un espectro extremadamente amplio de adaptación a los diversos hábitat, apareciendo desde el bosque tropical al desierto, a veces en medios tan difíciles que constituye para el hombre la única fuente de leche, carne y piel. En este sentido, los citados autores (Raggi y col., 1985) comentan cómo, de manera general, la distribución de una especie sobre la tierra indica el grado de su adaptación y habituación. Desde el comienzo de la domesticación de la cabra, se han ido desarrollando distintas razas al adaptarse a diferentes condiciones, razas que constituyen hoy una de las mayores riquezas agrarias de muchos países. Su aportación como fuente económica, como animal productor de carne y leche, es hoy sumamente importante en la India, Oriente Medio, norte de África, cuenca mediterránea y en algunos países de América. Coexiste con la oveja en muchas de las zonas habitadas por esta especie y vive en los lugares climatológicamente más extremos, resultando más activa y hábil en cuanto a conseguir alimento. Su rango ecológico se extiende desde zonas lluviosas tropicales hasta desiertos, incluso en los países más accidentados, presentando una mejor adaptación si nos referimos a situaciones extremas, en los climas calurosos y secos, que cualquier otra especie doméstica.

Boza (1983) comenta cómo en el curso de su adaptación para sobrevivir en ambientes desfavorables, la cabra ha desarrollado diversas características anatómicas y fisiológicas que le permite utilizar muy eficazmente los recursos disponibles, incluso con un bajo consumo de agua. Hafez (1968) también comenta el bajo consumo y excreción de agua que presenta la cabra, que es el más importante signo de adaptación a las condiciones áridas o desérticas, mostrando una gran eficiencia en cuanto a la economía del agua en dichas condiciones.

Shkolniz y colaboradores (1980) nos hablan de la economía del agua de la cabra beduina en el desierto de Negev, en Israel, cabra que con unos 25 kg de peso vivo, bebiendo cada 48h,

produce 2 kg de leche/día, perdiendo durante la privación de agua, de un 25 a 30% de su peso, que es recuperado después de la ingestión de agua. En opinión de estos autores, el rumen, aparte de su importante papel en la digestión de la celulosa, se comporta como un gran reservorio de agua, pudiendo almacenar cantidades que pueden llegar al 4% de su peso, lo que le permite mantener la tasa de turnover de agua junto a altas producciones de leche, en zonas en las que otros animales raramente lograrían mantenerse.

Boza (1983) comenta cómo esta habilidad que muestra la cabra de reducir las pérdidas de agua junto a su almacenamiento en el rumen, alcanza una relevante importancia en las zonas áridas y semiáridas del clima mediterráneo, caracterizado por la falta de agua, veranos prolongados y secos y escasez de alimentos, los que a la vez resultan de baja calidad por su alto contenido en fibra. Esta alta tolerancia a los ambientes con insuficiencia en agua, parece también deberse, a su capacidad de no disminuir su ingesta frente a altas temperaturas, con el consiguiente alto rendimiento en agua metabólica (Raggi y col., 1985).

Respecto del efecto de las altas temperaturas normalmente existentes durante el verano en las zonas áridas y semiáridas, Raggi y colaboradores (1985) indican cómo en la cabra, la pérdida de calor por evaporación de sudor juega un pequeño papel, existiendo evidencias claras de que suda menos que la oveja y mucho menos que el ganado vacuno. Además, se ha observado cómo estos animales tienen producción de calor metabólico más bajo. Como protección contra la absorción de calor, muchas cabras de los países cálidos tienen un pelo corto, fino, lustroso que cae de pleno sobre la piel y refleja una proporción considerable de calor incidente (French, 1970). Según Raggi y colaboradores (1985), esta pérdida por reflexión es la que hace a la cabra tener una zona de termoneutralidad con un límite superior bastante elevado. Junto a esto, los autores citados comentan que uno de los mecanismos usados incluso por algunos mamíferos, para defenderse de las condiciones térmicas, es cambiar estacionalmente de homeotermos a poiquilotermos, abandonando temporalmente el control más fino de su temperatura interna. En este sentido, Bligh y Harthorn (1965) observaron en el camello que habita en las zonas calurosas y desérticas del norte de África, una variación durante las 24h de su temperatura corporal bastante mayor que la de otros

mamíferos que conviven con él. Estos animales usan su cuerpo como condensador de calor, almacenando el absorbido o producido durante el día, y perdiéndolo por radiación durante la noche, mucho más fría. Esta facultad de ajustar dentro del día la temperatura corporal a la del ambiente, es a lo que se llama termolabilidad y heterotermos, a los mamíferos que la presentan (Bligh y col., 1976), pareciendo ser la cabra una de estas especies (Raggi col., 1985).

Boza (1993) indica cómo en ocasiones se ha definido a la cabra como un animal oportunista que forma su dieta con una mayor variedad de especies vegetales que los otros ruminantes domésticos, presentando como peculiaridad específica su preferencia por los alimentos lignocelulósicos, particularmente arbustos y ramones de árboles, con un mayor consumo de éstos en otoño e invierno, épocas en las que están disponibles en las zonas áridas.

En cuanto a la introducción de la cabra en España, Boza y Sanz Sampelayo (1984) informan, de que distintos datos arqueológicos nos hablan de su presencia desde tiempos muy remotos. Si bien su explotación ha sido tradicional durante siglos, ésta encuentra su período más floreciente durante la dominación musulmana. Boza y Sanz Sampelayo (1984) comentan cómo en el “Libro de las utilidades de los animales” (Anónimo, siglo XI), se dedica un capítulo a la cabra y en él se señalan las cualidades de la carne de cabrito que preserva la salud y es más equilibrada que la de cordero, su leche, que es la más sutil y parecida a la de mujer, indicándose igualmente, su empleo como antídoto de venenos.

Respecto a la explotación de esta especie en Andalucía, se conocen a través de textos geográficos algunos aspectos de la utilización de los recursos naturales en el Estado Cordobés, tal como la existencia de abundantes rebaños de cabras en zonas próximas a Cádiz (Sánchez Martínez, 1980).

Del Reino Nazarí granadino, se dispone de datos de censos, manejo y producciones documentadas por Álvarez de Cienfuegos (1958) y Cano (1974). Alonso de Herrera (1513) dedica en su obra “Agricultura general”, editada por primera vez en 1513, un capítulo a la cabra. Boza y Sanz Sampelayo (1984) comentan cómo en la citada obra se califica a la cabra

como especie que se sostiene muy bien y mejor que otros ganados, hasta el punto de referirse a ella en términos tales como “*nunca cabra se vio muerta de hambre*”. Narra sus hábitos alimenticios y modo óptimo de pastoreo, sus características, la manera y mejor tiempo de cría, etc. En relación con la calidad de la leche, se indica que “*después de la de mujer, es la mejor, incluso para los tísicos*”. Boza y Sanz Sampelayo (1984) comentan cómo lo recogido por Alonso de Herrera puede en parte referirse a conocimientos alcanzados en Andalucía, pues según nos dice Terrón, en la crítica a la última edición de esta obra, no debemos olvidar cómo el autor, que escribe su libro por encargo del Cardenal Cisneros, vivió algunos años en Granada y conoció la agricultura y ganadería hispanoárabe de la ciudad recién conquistada. Después de esta época, distintas vicisitudes de carácter histórico hicieron que la importancia de esta especie sufriera un duro revés. Sin embargo, el ganado caprino continuó siendo en la Edad Moderna una de las especies más importantes de Andalucía, lo que siguió sucediendo hasta la Edad Contemporánea.

En opinión de Boza y Sanz Sampelayo (1984) a pesar de todas las vicisitudes sufridas, un futuro prometedor parece vislumbrarse para la ganadería caprina. Las peculiares características de Andalucía y su actual situación económica, determinan que la ganadería sea una de las industrias primarias de la que se puede esperar los mejores resultados a corto plazo. En la Andalucía seca, con relieve accidentado, se piensa que la cabra es la especie que mejor puede aprovechar los recursos de esas zonas. La existencia de grandes extensiones pobladas de vegetación arbustiva o semileñosa de escaso rendimiento, áreas montañosas con producciones vegetales poco accesibles, zonas de monocultivos (cereal, olivar, oleaginosas, remolacha), con escasa ganadería y en donde quedan subproductos de interés para la alimentación animal, o, finalmente, áreas de la agricultura intensiva (vega y costa) con grandes cosechas que dejan abandonados residuos que, en la mayoría de los casos, son quemados, constituyen los medios por los que estos recursos pueden ser transformados en leche y carne, colaborando a la vez a estabilizar dichos ecosistemas (Boza y Sanz Sampelayo, 1984).

El censo caprino en España en 2002 según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2004) era de 3.046.716 cabezas, de las que 1.278.811 se encontraban en Andalucía, lo que representa el 42,0% del total. En el mismo año, la producción de leche de cabra en España fue de 489 millones de litros, de los cuales 253,2 millones se produjeron en Andalucía, lo que supone un 51,8% de la producción total. Estos datos hablan de la gran aptitud lechera de las principales razas andaluzas, mostrando a esta Comunidad como la zona de nuestro país más importante en lo que a producción de leche caprina se refiere.

2.2.- La leche como alimento

Como indica Mahé (1997), la leche es un líquido fisiológico complejo secretado por los mamíferos con el fin de que sirva de alimento para el recién nacido. Todas las leches contienen proteínas específicas, grasas cuya composición las hace fácilmente digestibles, lactosa, minerales, vitaminas, así como otros componentes que juegan un papel importante desde un punto de vista nutritivo. La organización de los componentes de la leche es la siguiente: lípidos en emulsión, constituidos por glóbulos protegidos por una cubierta, miscelas de proteína en dispersión coloidal, minerales y lactosa en forma de verdadera solución.

El origen de los componentes que constituyen este alimento, resulta doble. Parte de ellos se sintetizan en la glándula mamaria a partir de precursores sanguíneos (triglicéridos, proteínas, lactosa), y otra parte queda formada por elementos procedentes de una filtración selectiva de ciertos componentes de la sangre (sales minerales). La principal característica de la leche desde un punto de vista nutritivo, es que representa la única fuente de nutrientes para el recién nacido, debiendo por lo tanto satisfacer las necesidades específicas del mismo. Su principal interés radica en la calidad de sus proteínas, grasa y vitaminas, así como en su riqueza en determinados minerales. La composición de la leche varía de una especie a otra, reflejando los requerimientos específicos de cada uno de ellas, existiendo al mismo tiempo, una gran similitud dentro de una misma especie. La diferencia de composición según clase

de animal, se origina no sólo de acuerdo con factores genéticos específicos, sino también, por condiciones medioambientales, destacando en este sentido, la alimentación (Mahé, 1997).

La leche de vaca, así como de otras especies de rumiantes, bien directamente o en forma de productos derivados, constituye un alimento de singular importancia para el ser humano durante toda su vida. En el adulto, el consumo de productos lácteos, puede llegar a satisfacer del 60 al 80% de sus necesidades diarias de calcio, así como el 30-40% de los requerimientos de proteína, constituyendo igualmente, un 12-15% del consumo total de lípidos. Mahé (1997) igualmente informa de que en virtud de su composición, puede considerarse un alimento fuente tanto de macronutrientes como de micronutrientes. Los macronutrientes aportan al consumidor energía, junto con los nutrientes que intervienen en los procesos anabólicos (aminoácidos, ácidos grasos esenciales y minerales). Los micronutrientes (oligoelementos y vitaminas), actúan fisiológicamente a nivel del sistema endocrino e inmune. La leche contiene además, un cierto número de compuestos activos que juegan un papel tanto nutritivo como de protección, o como factores de crecimiento, actuando a nivel digestivo así como periférico (transportadores de nutrientes, factores antimicrobianos, hormonas, enzimas, etc.). Tanto para su consumo directo como en forma de productos transformados, la leche de vaca es la más empleada, en razón de su disponibilidad. Sin embargo, la procedente de otras especies de rumiantes puede constituir en base a su composición, una alternativa a la de vaca, sobre todo en determinados casos, que resultan especiales, en razón de sus requerimientos específicos (Boza y Sanz Sampelayo, 1997).

2.2.1.- Características de composición específica de la leche de cabra

Las principales diferencias existentes entre las distintas especies de rumiantes productores de leche (vaca, cabra, oveja) se refieren a esfera reproductiva, susceptibilidad a determinadas enfermedades, y muy particularmente, al aspecto nutritivo, mostrando un distinto comportamiento alimentario con distinta eficacia en la utilización de los nutrientes, circunstancias que finalmente, afectan a la composición de su leche. En lo que se refiere a la composición de la leche de cabra, se la considera en la actualidad, como poseedora de unas

características sumamente beneficiosas, las que le confieren un alto interés tanto como alimento, como objeto de investigación.

Uno de los aspectos de su composición más interesantes ligados a la leche de cabra, es el que se refiere a la naturaleza de su grasa. La leche de cabra presenta una grasa cuyo contenido en los llamados triglicéridos de cadena media (MCT), triglicéridos formados por ácidos grasos cuya cadena carbonada tiene entre 6 y 14 átomos de carbono, alcanzan normalmente, un porcentaje mayor del 30%, a diferencia de la leche de vaca que no alcanza de estos compuestos más del 20%. Estos MCT muestran un interés particular desde incluso un punto de vista terapéutico, a causa de su utilidad en determinadas enfermedades metabólicas (Haenlein, 1992, 1996; Boza y Sanz Sampelayo, 1997).

En efecto, los MCT se caracterizan por seguir en el organismo una vía de utilización metabólica distinta de los triglicéridos de cadena larga, ya que los ácidos grasos libres derivados de su hidrólisis, pueden ser absorbidos sin reesterificación, pasando directamente al sistema Porta, siendo de esa manera transportados al hígado y tejidos periféricos. Su bajo peso molecular e hidrosolubilidad, facilitan la acción de los enzimas digestivos, haciendo que su hidrólisis sea más rápida y completa que la de los triglicéridos de cadena larga y, a diferencia de éstos, la digestión de los MCT comienza a producirse en el estómago, ya que la lipasa gástrica, prácticamente sin acción sobre los triglicéridos de cadena larga, inicia la hidrólisis de los MCT, la que será completada por la lipasa pancreática, a un ritmo cinco veces superior a la hidrólisis de los triglicéridos de cadena larga (García Unciti, 1996).

Los ácidos cáprico y caprílico, así como otros ácidos constituyentes de los MCT, han llegado a constituir tratamiento específico en pacientes aquejados de diferentes casos de malabsorción, insuficiencia pancreática, fibrosis quística del páncreas, pancreatectomía, déficit o ausencia de sales biliares como en la hepatitis crónica o neonatal, cirrosis biliar o alcohólica, ictericia obstructiva, padecimiento de esteatorrea, e hiperlipoproteinemia, así como en los afectados de resección intestinal o los que sufren de insuficiencia coronaria, utilizándose también este tipo de compuestos, en la alimentación de pacientes desnutridos,

niños prematuros y epilepsia infantil, entre otras patologías, todo ello en base a la facilidad con que estos compuestos son capaces de generar energía, resultando dicha utilización en este caso, no dependiente del sistema carnitina, repercutiendo a la vez, sobre el metabolismo lipídico, dando lugar a una caída en los niveles de colesterol a nivel hemático (Tantibhedhyangknl y Hashim, 1975, 1978; Babayan, 1981; García Unciti, 1996; Alférez y col., 2001), aunque también se han establecido efectos negativos del consumo de MCT en forma de compuestos puros (Velázquez y col., 1996), derivándose en consecuencia, la conveniencia de su consumo a partir de alimentos naturales especialmente ricos en los mismos, como es la leche de oveja y cabra.

De manera general, en el estudio comparativo de la composición de la leche de cabra, frente a la de vaca, se aprecian unos mayores contenidos en los ácidos caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0) y láurico (C12:0), difiriendo también en cuanto al contenido en ácidos grasos de cadena ramificada (Holsinger, 1982; Haenlein, 1992).

Uno de los componentes de la leche de cualquier especie más importante desde el punto de vista nutritivo, son las proteínas. Refiriéndonos a la leche de cabra, existe una información contradictoria en relación con la composición aminoacídica que la proteína de su leche presenta, encontrándose datos indicativos de una mayor concentración de lisina y/o aminoácidos azufrados, en la leche de cabra frente a la de vaca o viceversa, información que indica la variabilidad que en el sentido indicado, la leche de ambas especies pueden alcanzar (Jaudal, 1996).

Dado que el interés de la leche de cabra, radica esencialmente, en que constituye una leche industrial, que se deriva en su mayor parte a la industria de transformación, especialmente para la fabricación de queso, las proteínas más interesantes resultan ser las caseínas, proteínas coagulables, que determinan el rendimiento de fabricación indicado y, por tanto, la calidad tecnológica de la leche en cuestión.

Por caseínas se entiende a un grupo de proteínas de la leche, caracterizado por presentar uniones éster-fosfato, un alto contenido en prolina y bajo en cisteína. Como indica Jennes

(1974) resulta difícil el definir de manera precisa, a las caseínas de una leche en razón de su composición. Una definición práctica es la que indica que se trata de proteínas lácteas que precipitan a un pH=4,6 quedando constituidas por partículas complejas en forma de miscelas (Jennes, 1974). Las proteínas que permanecen en solución a pH=4,6 son las del lactosuero, formadas por α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, inmunoglobulinas, péptidos y otras proteínas menores, algunas con carácter enzimático.

Como en la leche de vaca, en la de los pequeños rumiantes, se encuentran las caseínas α_{S1} , α_{S2} , β y κ . Estas diferentes caseínas lo son en razón de su composición, caracterizándose en la vaca, la α_{S1} y β -caseína, por presentar altos contenidos en prolina, mientras que la κ -caseína se diferencia de las anteriores en razón de las uniones con carbohidratos junto a numerosos puentes disulfuro.

Como componentes de la proteína láctea, existen seis productos genéticos de la glándula mamaria de carácter mayoritario: α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína y κ -caseína, β -lactoglobulinas y α -lactoalbúminas, todos los cuales exhiben polimorfismo genético, puesto que son productos de genes autosomales, alélicos, codominantes (Swaisgood, 1993).

En relación con la leche de cabra existe un polimorfismo genético ligado a la composición de su proteína en razón de la presencia en mayor o menor cantidad, o incluso ausencia de la α_{S1} -caseína, aspecto de singular interés, ya que es capaz de determinar la calidad tecnológica de esta leche así como la nutritiva o incluso saludable de la misma, distinguiéndose en este sentido, cuatro clases diferentes: nivel nulo (0), ausencia total de α_{S1} -caseína, niveles bajos (F, D), niveles altos (A, B, C,) e intermedios (E) (Haenlein, 1996).

Los aspectos de composición y comportamiento tecnológico más importantes ligados a la presencia de α_{S1} -caseína en la leche de cabra, son:

- Mayor contenido en sólidos totales
- Mayor contenido en proteínas
- Mayor contenido en caseínas

Mayor rendimiento en queso

Mayor tiempo de coagulación

Mayor resistencia al calor

Mayor firmeza del coágulo a los 30 minutos

Mayor valor de pH

Haenlein (1996)

Los aspectos indicados confieren a la leche de cabra alta en α_{S1} -caseína, una mejor calidad tecnológica, lo que en razón del destino preferencial que la leche de cabra hoy por hoy presenta, es la causa de que se practique en los rebaños, programas de selección para ir aumentando el número de individuos pertenecientes a los niveles altos de producción de α_{S1} -caseína.

Sin embargo, es necesario hacer constar que no bajo todos los aspectos puede considerarse de mejor calidad la leche de cabra con niveles altos de α_{S1} -caseína. En efecto, si la presencia de α_{S1} -caseína da lugar a una leche con mayor tiempo de coagulación, y en consecuencia, con un igualmente, mayor rendimiento en queso, la ausencia de dicha caseína, origina una leche que al presentar un menor tiempo de coagulación, puede dar lugar cuando se consume directamente, a un mayor aprovechamiento digestivo de diferentes nutrientes (Haenlein, 1996). La rápida coagulación a nivel del estómago, determina un freno de los distintos componentes que el coágulo engloba, proteína, grasa y calcio, los que poco a poco van siendo posteriormente liberados, abandonando el estómago y pasando al intestino delgado, vía que establece a ese nivel, un máximo aprovechamiento (Ruiz Mariscal, 1991).

Igualmente, se han realizado numerosos estudios que han llevado al convencimiento de que, en determinadas circunstancias, como en los síndromes de malabsorción, las proteínas de la leche de vaca pueden producir problemas de hipersensibilidad, no sólo en lactantes sino también en niños y adultos. Como consecuencia de esto, se han llevado a cabo estudios para ofrecer alternativas al uso de esta leche. A este respecto, en un informe de la Comisión de la Comunidad Europea (1991), se aconseja el empleo de leche de cabra en niños con riesgos

alérgicos y en los que sufren hipersensibilidad a las proteínas de la dieta, habiendo sido igualmente, la leche de cabra evaporada o en polvo, recomendada en las fórmulas de leches infantiles (Juntunen y Ali-Yrkko, 1983; Coveney y Darnton-Hill, 1985).

La sustitución de la leche de vaca por la de cabra en los casos de alergenicidad a la primera, demuestra que en un 40% de los casos, los sujetos presentan una tolerancia normal a la proteína de la nueva leche. Sobre los motivos que determinan que no sea útil dicho cambio en un 100%, empieza hoy a pensarse en la importancia que al respecto, pueda nuevamente tener la composición de la proteína en razón del polimorfismo genético asociado a la misma. Si lo que se pretende es hacer cambiar la composición de la proteína de la leche de vaca por la de cabra, quizás habría que tener en cuenta que la leche de cabra más diferente de la de vaca, en razón de su composición proteica, sería la que presentara un nivel nulo de α_{S1} -caseína, leche por la que tendría que ser la primera cambiada (Bevilacqua y col., 2000). En relación con este tema, destaca la falta de una información precisa sobre la alergenicidad de la leche de cabra frente a la de vaca.

En este punto hay que recordar lo indicado por Matassino y colaboradores (1990), autores que en la reunión anual de la Federación Europea de Zootecnia del año 1990, ya indicaron que en un futuro “sería necesario producir leche de una alta calidad, diversificada en razón de su destino” (consumo directo, fabricación de queso, fraccionamiento industrial para obtener sus distintos ingredientes, etc.). Una leche de cabra alta en α_{S1} -caseína presentará, por tanto, una igualmente, alta calidad tecnológica, mientras que la baja o carente en α_{S1} -caseína, podría mostrar una mejor calidad nutritiva, convirtiéndose de esa manera, en posible alimento de elección para determinados estratos de la población en razón de sus requerimientos.

Por lo tanto, y de acuerdo con los aspectos aquí considerados, tanto desde un punto de vista nutritivo como saludable, la leche de cabra muestra una composición que sin duda le confiere un particular interés. De manera general y en cuanto a la naturaleza de su grasa, hemos destacado su contenido en MCT en razón de las propiedades de estos compuestos. Independientemente de esto, resulta bien conocido cómo la grasa de la leche de cabra

presenta en razón del tamaño de sus miscelas y de su estado de homogeneización, una alta digestibilidad (Boza y Sanz Sampelayo, 1997; Alférez y col., 2001).

Respecto de la naturaleza de la proteína, se ha comentado, igualmente, la importancia de considerar su composición, según su contenido en la fracción α_{S1} -caseína.

Además y de manera general, igualmente se conoce que la proteína de esta leche, presenta una alta digestibilidad y valor biológico, aspectos que resultan superiores a los de la proteína de la leche de vaca (López-Aliaga y col., 2003; Ramos Morales y col., 2005).

A modo de conclusión y, a la vista de lo comentado, puede indicarse que desde el punto de vista de una alimentación humana saludable, la leche de cabra posee peculiaridades (estructura física y perfil químico de su grasa, fracciones de sus proteínas, fácil digestión, mínimas reacciones alérgicas, etc.), que aconsejan su empleo, al menos, en personas con intolerancia a la leche de vaca o con diversas patologías que precisen de alimentos de fácil digestión y utilización de nutrientes. Estos aspectos de su particular valor nutritivo, son conocidos a nivel popular desde hace siglos, terminando en este sentido, analizando lo que sobre la leche de cabra, Alonso de Herrera ya manifestó en su Tratado General de Agricultura, publicado en 1513: *“La leche de las cabras, mayormente de las prietas, es muy buena para las personas comida por las mañanas, y tanto mejor cuanto de mejores pastos comieren, es muy singular cosa para los viejos, y para los niños, que después de la leche de mugeres, la de las cabras es la mejor, y aun para los tísicos, que da mucha sustancia, y consuela los pulmones llagados”*.

2.3.- Estudios realizados con el fin de determinar el valor nutritivo de la leche de cabra

Debido a su particular composición la leche de cabra se considera hoy un alimento con el que no sólo es posible sustituir a la de vaca, en los casos en que ésta última no esté disponible, sino que puede convertirse en alimento de elección en determinados casos, para ciertos estratos de la población, en razón de sus requerimientos específicos (Haenlein, 2004).

En los últimos tiempos, numerosos estudios pretenden poner de manifiesto las principales diferencias que entre la leche humana, de vaca y cabra existen, disponiéndose hoy de una extensa bibliografía que trata de aclarar el valor nutritivo que la leche de cabra puede presentar, sobre todo en lo referente a su empleo en la alimentación infantil. Debido a la abundante bibliografía e interés suscitado por el tema, en el 1996, el INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, Francia), celebra uno de sus Coloquios sobre temas de actualidad, titulado: “Intérêts Nutritionnel et Diététique du Lait de Chèvre”, reunión en la que se abordaron distintos temas en relación con las características y la calidad nutritiva de la leche de cabra. Igualmente, en Francia, en el año 2000, el Institut Technique des Produits Laitiers Caprins, realiza y publica una recopilación bibliográfica, que titula: “Lait de Chèvre: Composition et valeur nutritionnelle, une bibliographie”. En relación con diferentes aspectos de la composición de la leche de cabra, se recogen 319 citas, sobre su empleo en la alimentación del ser humano, 77, indicándose cómo en contra de su empleo (señalando aspectos de su composición de efectos negativos), se recogen sólo 26 citas, y a su favor, el resto. Otras 59 citas, se refieren a otros aspectos relacionados con el consumo de este alimento, como: aspectos microbiológicos, sustitución de la leche de vaca por la de cabra y alergenidad de ésta última.

El aspecto más negativo referente a la composición de la leche de cabra, es el que se refiere a su contenido en ácido fólico y vitamina B₁₂. Distintos casos de anemia atribuida al consumo de leche de cabra, se indica cómo quedaban curados al administrar simplemente, ácido fólico (Jennes, 1980). Sobre este aspecto, Park (2006), en una reciente revisión, comenta cómo en un principio, la anemia producida por el consumo de leche de cabra, determinaba en los niños, una anemia megaloblástica, que se atribuía a la deficiencia en vitamina B₁₂ (Parkash y Jennes, 1968). Sin embargo hoy se conoce cómo la causa principal de dicha anemia reside en la deficiencia en folato. En general, la leche de vaca tiene cinco veces más folato y vitamina B₁₂ que la de cabra, siendo el folato necesario para la síntesis de hemoglobina, hechos que indican la necesidad de suplementar los productos lácteos correspondientes, con dichas vitaminas (Park, 2006).

Otros aspectos ligados a la composición específica de la leche de cabra, la presentan hoy, como un alimento de particular interés, resultando en este sentido, de particular importancia, los referentes a su composición proteica y a la de su grasa.

La fracción proteica de la leche constituye un sistema extremadamente complejo, diferenciándose según la especie, tanto cuantitativa como cualitativamente. Comprende más de treinta especies moleculares, de acuerdo con la expresión de sus genes estructurales que codifican seis diferentes cadenas peptídicas, incluyendo las dos proteínas séricas más importantes, (α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina) y las cuatro caseínas (α_{S1} , α_{S2} , β y κ), las que interaccionan en presencia de fosfato cálcico para formar miscelas. Como en la leche de vaca, en la de cabra, la fracción constituida por las caseínas, alcanza sobre el 80% de la proteína total. Posteriores modificaciones, (fosforilación, glicosilación, proteólisis), son las responsables de la multiplicidad de formas proteicas que en cada caso puede ser observadas. Además, un pronunciado e incluso inusual polimorfismo genético, puede dar lugar a una mayor variabilidad, lo que sin duda añade complejidad al sistema. Esto último resulta especialmente cierto en relación con la α_{S1} -caseína, habiéndose encontrado en la leche de cabra, siete variantes proteicas, asociadas con cuatro niveles diferentes de síntesis (entre 0 y 3,6 g/l por alelo). Debido a esto, Marti (1997) comenta cómo teóricamente, es posible modular la composición de la leche de cabra según el genotipo correspondiente.

Junto a la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, en el suero lácteo existen otros componentes proteicos a más bajas concentraciones, los que ejercen funciones especiales como la de una protección local (mucosa mamaria de la madre, mucosa intestinal y bucal en el recién nacido). Entre estas proteínas se encuentran las inmunoglobulinas (IgA, IgG), lactoferrinas y enzimas con acción bactericida y bacteriostática. Junto a esto, Marti (1997), igualmente informa de que las caseínas liberan péptidos activos biológicamente, los que median determinadas funciones a nivel neuroendocrino e inmunológico. La variabilidad estructural dentro (inducida por el polimorfismo genético y empalmes) o entre especies,

proporciona una gran diversidad en cuanto a la composición proteica de la leche, resultando aún desconocida la función especial que cada una de ellas puede llegar a desarrollar.

2.3.1.- Valor nutritivo de la leche de cabra en función de su composición específica. Utilización de su proteína y grasa

En cuanto al aprovechamiento a nivel nutritivo de la proteína de la leche de cabra frente a la de vaca, distintos autores indican cómo el aprovechamiento de la primera resulta más alto y digestible, en razón de que llega a formar en el estómago un coágulo más pequeño, blando y fragmentable, circunstancias que favorecen la acción de las proteasas digestivas (Devendra y Burns, 1970; Park, 1994). En opinión de Haenlein (2004), la distinta composición de la proteína de la leche de cabra frente a la de vaca, en el sentido de presentar la primera una menor proporción de caseínas y más altos porcentajes de proteínas séricas, más saludables, podría ser la causa determinante del distinto modelo de coagulación que en el abomaso tiene lugar para la proteína de la leche de ambas especies, y en consecuencia, de su aprovechamiento nutritivo. Debido a esto y en razón del alto polimorfismo existente en la cabra en relación con el contenido en α_{S1} -caseína de su leche, aquélla que presenta niveles bajos o nulos de dicha fracción, muestra unos rendimientos en el proceso de coagulación más bajos, junto a unos tiempos más largos, aspectos que en opinión de Ambrosoli y colaboradores (1988), pueden quedar relacionados con los efectos beneficiosos que a nivel digestivo, parece presentar el tipo de leche de cabra indicado. De igual manera y en función de su distinta composición, Fabre (1997), Grzesiak (1997) y Reinert y Fabre (1997) indican cómo la proteína de la leche de cabra resulta frente a la de vaca, menos alergénica presentando a la vez una mejor digestibilidad.

En cuanto a los resultados encontrados a nivel experimental, Kumar y colaboradores (1986) determinan el valor biológico y la digestibilidad de la proteína de la leche de cabra, deduciendo unas cantidades iguales a 89,29 y 92,42 respectivamente. Février y colaboradores (1993) comentan cómo la leche de cabra se utiliza como base de alimentos infantiles, comparándose su valor nutritivo con el de la leche de vaca, sin tener en cuenta su distinto

contenido tanto en proteína como en grasa. Los autores realizan un ensayo empleando lechones que se alimentaban en base bien a una leche de cabra o de vaca, las que presentaban un mismo contenido tanto en proteína como en grasa, recibiendo los animales a la vez una cebada complementada con minerales y vitaminas. La digestibilidad de los distintos nutrientes se detectó no diferente según tipo de leche consumida, a excepción de los minerales, los que resultaban mejor utilizados en el caso de consumo de leche de cabra. Estos mismos autores (Février y col., 1993) empleando animales con anastomosis íleo-cecal, deducían una menor digestibilidad de la cistina, glicina, tirosina e histidina, en el caso de consumo de leche de cabra, resultando el resto de los aminoácidos igualmente bien utilizados, especialmente la lisina que alcanzaba un coeficiente igual a 0,95. La tasa de crecimiento, el coeficiente de eficacia en crecimiento, junto a las cantidades totales tanto de grasa como de tejido muscular, resultaron equivalentes en ambos grupos. Respecto del peso del jamón y lomo de los animales, los valores del jamón resultaron más altos bajo consumo de leche de cabra, sucediendo lo contrario para el caso del lomo. Los autores concluyen cómo a partir del modelo experimental empleado, el valor nutritivo deducido para la leche de cabra, no resulta significativamente diferente del de vaca.

Posteriormente, Février y colaboradores (2000), alimentan de manera forzada a tres lotes de lechones, bien con leche de vaca o cabra con un alto contenido en α_{S1} -caseína y con nulo contenido en dicha fracción. La concentración en materia seca o en consecuencia, la de la energía digestible, resultaba menor en el último de los tres tipos de leche empleados. La digestibilidad a nivel ileal de los aminoácidos resultaba más baja con el consumo de la leche de cabra libre de α_{S1} -caseína, lo que ocurría concretamente, para el caso de la treonina, serina, ácido glutámico, tirosina y arginina. Recientemente López-Aliaga y colaboradores (2003), utilizando en ratas dietas en las que parte de su proteína procedía de leche de cabra o vaca, deducen cómo la dieta con la proteína de leche de cabra, presentaba una digestibilidad más alta que la que incluía la proteína de leche de vaca, resultando igualmente más altos los valores de balances de N.

Como se ha indicado anteriormente, el aspecto específico de mayor interés de la composición de la leche de cabra frente a la de vaca, es el que se refiere a la naturaleza de su grasa, particularmente rica en MCT, los que junto con presentar un metabolismo muy particular, determinan distintos efectos beneficiosos sobre la salud, los que vienen siendo desde hace tiempo analizados y revisados (Haenlein, 1992, 2001, 2004; García Unciti, 1996; Boza y Sanz Sampelayo, 1997).

2.4.- Metabolismo particular de los MCT. Aspectos de mayor interés

De manera general ya hemos comentado cómo los MCT se metabolizan de manera diferente a los triglicéridos de cadena larga, siendo fácilmente hidrolizados en el tracto digestivo, proceso que comienza incluso en el estómago por acción de la lipasa pregástrica salivar, pudiendo incluso iniciarse su absorción directamente a dicho nivel, siendo a continuación totalmente hidrolizados y absorbidos en el intestino. A esta rápida y eficiente digestión de los MCT, le sigue un igualmente rápido catabolismo oxidativo, mostrándose estos compuestos como excelentes fuentes de energía (Leyton y col., 1987; Aourousseau y col., 1989; Velázquez y col., 1996; Matsuo y Takeuchi, 2004).

Leyton y colaboradores (1987) comentan concretamente, cómo los ácidos grasos de los MCT, tales como el laúrico y mirístico, pueden ser captados por el hígado donde llegan vía vena Porta, siendo seguidamente oxidados, proceso diferente por ejemplo, del que sufren los ácidos palmítico y esteárico, que alcanzan el hígado vía sistema linfático, necesitando un período de tiempo bastante más largo antes de que queden disponibles para poder ser oxidados. Estos mismos autores (Leyton y col., 1987) comentan que mientras que el ácido laurico y mirístico se utilizan esencialmente a nivel metabólico como fuentes de energía en el proceso respiratorio de distintos tejidos, el ácido palmítico y esteárico una vez absorbidos, pueden ser utilizados directamente o almacenados en forma de triglicéridos y fosfolípidos para un uso posterior.

Revisando la información disponible al respecto, Velázquez y colaboradores (1996), indican cómo los MCT se metabolizan más rápidamente que lo hacen los triglicéridos de

cadena larga, originando una descarga de energía que queda disponible para ser utilizada. Los MCT pueden llegar a saturar las vías metabólicas, lo que les permite incorporarse al ciclo de Krebs y ser metabolizados de un modo alternativo, originándose cetonas (acetoacetato y β -hidroxibutirato). Estos cuerpos cetónicos pueden ser utilizados como combustible a nivel de los tejidos periféricos. En este sentido, igualmente se comenta cómo determinados pacientes en procesos post-operatorios o de shock, llegan a formar cuerpos cetónicos dentro del tejido muscular como una forma alternativa de combustible, reduciéndose en consecuencia, los procesos de proteólisis que en tales circunstancias pueden llevarse a cabo a partir de aminoácidos ramificados. Por esto, los MCT se han propuesto como fuentes de energía diferentes a los carbohidratos, que pueden resultar extremadamente útiles en determinados casos, por ejemplo, en la intolerancia a la glucosa.

Auroseau y colaboradores (1989) comentan los efectos de los MCT sobre el balance de N y sobre la eficiencia de utilización del alimento para el crecimiento. Diferentes resultados experimentales apuntan a considerar cómo ambos aspectos, indicativos de la utilización de la proteína, pueden mejorarse al incluir en la dieta una grasa rica en MCT, lo que induce a que los autores indicados, diseñen un lactorreemplazante para corderos que incluía en su composición una grasa rica en MCT. La digestibilidad de la energía se incrementaba de manera significativa así como la del N. La hidrólisis de los MCT en el estómago del pre-rumiante, facilita el que tenga lugar una mayor degradabilidad de la proteína del coágulo en el que este nutriente queda englobado, suposición con la que Ternouth y colaboradores (1975) pretendieron justificar el efecto anteriormente comentado. Junto a esto, se ha descrito cómo el ácido caprílico (C10:0) es capaz de alterar la organización de la membrana celular, facilitando de ese modo la absorción de grandes moléculas (Kajii y col., 1986). Del mismo modo, un cambio en el potencial redox a nivel mitocondrial, por medio de sustratos fácilmente metabolizables, parece que puede conducir a un aumento en el flujo de energía a nivel intestinal, lo que podría facilitar la absorción de aminoácidos (Kimura y Warshaw, 1988; Auroseau y col., 1989).

En base a una serie de ensayos llevados a cabo con cabritos prerrumiantes, se han obtenido unos resultados de los que se deduce igualmente, el particular comportamiento metabólico de los ácidos grasos contenidos en los MCT, en el sentido de no ser depositados a nivel corporal sino más bien oxidados o elongados a nivel del hígado (Pochoiba y col., 1990; Yeon y col., 2002; Sanz Sampelayo y col., 2006a). El más alto crecimiento conseguido por los animales, así como su mejor desarrollo muscular, apuntan igualmente, a considerar la posible ayuda que dichos compuestos pueden ejercer a nivel de la utilización de la proteína (Sanz Sampelayo y col., 2006a).

Igualmente se dispone hoy de algunos resultados de los que se deduce la mejor utilización que la grasa de la leche de cabra, presenta frente a la de vaca. Hachelaf y colaboradores (1993), en niños que presentaban síndrome de malabsorción, sustituyen la leche de vaca que consumían por leche de cabra, derivándose una mejor absorción de su grasa. Razafindrakoto y colaboradores (1993) tratan a niños desnutridos de 1 a 5 años, con leche de vaca o cabra, la que administraban junto a la dieta normal consumida por los mismos. El grupo que consumía la leche de cabra, alcanzaba un mayor crecimiento junto a una igualmente más alta absorción de la grasa. Alférez y colaboradores (2001) determinan en ratas, el aprovechamiento de una dieta en la que la totalidad de su grasa, procedía de una leche de cabra o vaca. Los animales que consumían la dieta con la grasa procedente de leche de cabra, mostraban una digestibilidad de la misma sensiblemente más alta, que la alcanzada por los que consumían la dieta con grasa de leche de vaca, determinándose al mismo tiempo, cómo los niveles de colesterol resultaban para el caso de consumo de la grasa de leche de cabra, más bajos.

Igualmente de interés resulta el indicar cómo ciertos resultados beneficiosos, obtenidos al utilizar una dieta en la que su grasa procedía de leche de cabra y no de vaca, tales como la utilización de su grasa y proteína (Alférez y col., 2001; López-Aliaga y col., 2003) o determinados minerales (Campos y col., 2003; López-Aliaga y col., 2003), se justifican en base a la diferente disponibilidad energética que la leche de cabra origina, en razón de la riqueza en MCT que su grasa presenta.

2.5.- Valoración de la calidad de una proteína. Importancia del aporte energético

La valoración de la calidad de una proteína puede realizarse de diferentes maneras, quedando implicadas la determinación bien de diferentes medidas químicas y/o ensayos o tests de carácter biológico. Para ello, cada vez se llevan a cabo ensayos en modelos animales apropiados, de los que en cada caso, se deriva la información considerada necesaria. A pesar de ello y como explica la United Nations University (UNU) (1980), estos estudios pueden presentar ciertas limitaciones en razón de la composición aminoacídica de la proteína en cuestión o bien, de la disponibilidad de sus aminoácidos. La función para la que la proteína en estudio va a ser utilizada, es otro aspecto a tener en cuenta, conociéndose en este sentido cómo la calidad de una proteína puede ser diferente, si se utiliza bien para mantenimiento, crecimiento o lactación.

Otras consideraciones a tener en cuenta, son aquéllas derivadas de las condiciones bajo las que la proteína se valora experimentalmente y las que pueden existir cuando las condiciones son más bien de carácter práctico.

Por esto se indica, cómo la utilización de una proteína puede variar de acuerdo con el nivel empleado de la misma y la historia nutritiva del animal. De igual manera, los resultados experimentales obtenidos en animales al ser extrapolados en humanos pueden dar lugar a cambios en su valor. Al mismo tiempo, la realización de diferentes tipos de ensayos pueden originar cifras distintas. Éstas y otras consideraciones son comentadas en el tratado publicado por la UNU (1980) sobre la valoración nutritiva de la proteína de los alimentos.

Cuando lo que se pretende es valorar una fuente proteica frente a otra, los ensayos realizados emplean éstas a un mismo nivel, llevándose a cabo la valoración bien por medio del establecimiento de los correspondientes balances de nitrógeno o simplemente mediante la cuantificación del crecimiento en cada caso alcanzado.

Los ensayos de crecimiento y balance son métodos indirectos de predicción de la disponibilidad de aminoácidos. Consisten en métodos biológicos, los que se llevan a cabo

empleando un modelo animal adecuado. Suelen considerarse métodos de referencia, pues permiten estimar la calidad proteica en cuestión, en condiciones prácticas de alimentación.

Por supuesto, el método más simple para determinar el valor nutritivo de una proteína se basa en medir la tasa de crecimiento en animales jóvenes o en crecimiento. Osborne y colaboradores ya en el año 1919, idearon un índice para expresar lo anteriormente indicado. Este índice es el llamado Coeficiente de Eficacia en Crecimiento (CEC), en inglés, Protein Efficiency Ratio (PER), el que resulta igual al incremento de peso conseguido partido por la ingesta proteica correspondiente. Los citados autores (Osborne y col., 1919) ya indicaron cómo este índice varía con el nivel de proteína en la dieta, usándose en general el nivel del 10%, hasta que la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) estandarizó el procedimiento recomendando el nivel 9,09% (Derse, 1962). Más tarde la AOAC (1975) recoge este mismo índice comparándolo con el obtenido bajo consumo de una caseína.

Los índices basados en el cambio de peso corporal, son criticables en base a que la ganancia de peso vivo no es constante en composición, debiéndose no sólo al aumento en el contenido proteico, sino también a la retención de grasa. Los índices basados en los cambios del nitrógeno corporal son los métodos clásicos de referencia de una valoración proteica. Por medio de ellos se estima la retención de nitrógeno, bien directa (método de los sacrificios comparados) o indirectamente, mediante el establecimiento del balance de nitrógeno, es decir, la diferencia entre la ingesta y las pérdidas habidas por heces y orina. La mayor fuente de error de los métodos basados en el balance de nitrógeno, reside en la imposibilidad de recuperar cuantitativamente la totalidad del mismo, excretado por el animal.

El conocimiento de la retención de nitrógeno como vía de establecimiento del valor de una proteína, resulta sin duda, una de las más empleadas. Por medio de la ingesta y excreción de nitrógeno por heces y orina, la retención aparente se estima o determina de manera más exacta si se lleva a cabo a la vez, un ensayo con dieta libre de proteína, que permite conocer las llamadas pérdidas endógenas. Junto a la digestibilidad aparente o verdadera (% absorbido del ingerido), es posible determinar la llamada utilización neta proteica (% retenido del

ingerido) o valor biológico (% retenido del absorbido). El nivel de proteína en la dieta resulta ser de manera convencional del 10% (UNU, 1980). De este modo, se permite comparar los resultados obtenidos con distintas proteínas, conociéndose cómo la utilización resulta más alta bajo niveles más bajos de ingesta de alimentos y, más baja, cuando la ingesta se incrementa.

Para la realización de las pruebas biológicas correspondientes, se suele utilizar, junto al nivel indicado de proteína, una composición total de la dieta que se ajuste a lo aconsejado por el American Institute of Nutrition (AIN) (Reeves y col., 1993), llevándose a cabo los ensayos en ratas al destete, las que dispondrán de agua *ad libitum*, y serán dispuestas en una cámara ecológica bajo condiciones de temperatura, humedad relativa y período de iluminación, estandarizado. La duración de los ensayos se programa normalmente, para cuatro semanas, llevándose a cabo durante la última el ensayo correspondiente de balance (Sanz Sampelayo y col., 2006b).

Para la utilización de la proteína por un animal y la estimación de su valor, hay que tener en cuenta cómo dicha utilización hasta lograr una formación y depósito a nivel corporal, resulta ser un proceso de alto costo energético. En consecuencia, la retención lograda a partir incluso de una misma ingesta, puede depender de la disponibilidad energética, no sólo en cuanto a la cantidad, sino también calidad de la misma (Sanz Sampelayo y col., 1997). En este sentido, desde hace tiempo se conoce, la “ayuda” que en la utilización de una proteína ejerce muchas veces los carbohidratos de la dieta (Fuller y Crofts, 1977), identificándose más recientemente, un efecto similar por parte de la grasa, dependiendo de su composición (Leyton y col., 1987; Su y Jones, 1993; Jorgensen y col., 2003). Por lo tanto, la tasa y la eficiencia con la que el nitrógeno ingerido puede ser digerido, dependen tanto de la cantidad que de este elemento existe en la dieta, como de la disponibilidad energética. A un nivel dado de ingesta de nitrógeno, conforme aumenta la cantidad de energía disponible, más nitrógeno se retiene. Cuando la energía de origen no proteico se limita, la proteína de la dieta puede llegar a utilizarse con fines energéticos, y en consecuencia, la utilización de la proteína para la retención proteica, disminuye. Lo que se indica equivale a decir, que la proteína de una dieta, se utiliza de manera máxima para la síntesis proteica sólo, cuando esté disponible una

cantidad suficiente de energía en forma no proteica, habiéndose observado este fenómeno en animales en crecimiento, tanto en cerdos (Fuller y Crofts, 1977) como en cabritos (Sanz Sampelayo y col., 1997). Como indica Berschauer y colaboradores, (1983), estas consideraciones muestran claramente la relación existente entre el metabolismo proteico y energético y cómo, las necesidades energéticas para retención de proteína, dependen de la dieta en cuestión.

2.6.- Bioenergética – Termogénesis

La bioenergética se ocupa del estudio de las transformaciones energéticas en los sistemas vivos. A nivel fisiológico, el interés de estos estudios se centra en la obtención de una información con la que es posible conocer los procesos de transferencia y energía en el organismo animal y en su utilización en distintos procesos fisiológicos, como los correspondientes al mantenimiento de la homeostasis interna o más bien a la producción. La importancia de la información derivada del estudio de la utilización nutritiva desde un punto de vista bioenergético, reside esencialmente en su poder, tanto pormenorizador como sintetizador. Los últimos avances de este tipo de estudios, hacen hoy posible, el poder predecir de acuerdo con la cantidad y composición de la energía ingerida, la utilización de la misma según las vías metabólicas en cada caso implicadas (Ruiz Mariscal, 1991).

Por medio de los métodos de balance correspondientes, y determinando el contenido energético de las distintas muestras, es posible ir estableciendo los pasos de la utilización de la energía ingerida hasta establecer la cantidad que finalmente, se deposita a nivel corporal, bien en forma de proteína o grasa, o se utiliza para otros aspectos productivos. La energía ingerida (energía bruta) menos la excretada por heces y orina, y también en forma de metano, caso del rumiante, constituye la llamada energía metabolizable, la verdaderamente disponible a nivel metabólico, Agricultural Research Council (ARC) (1981).

La determinación de la energía retenida a nivel corporal puede establecerse bien directamente, por medio del llamado método de los sacrificios comparados, o indirectamente como diferencia entre la metabolizable ingerida y la pérdida de calor. En este último caso

será necesario establecer dicha pérdida por medio de alguno de los métodos colorimétricos disponibles (Hardy, 1974).

Los procesos que constituyen termogénesis (producción de calor asociado a la oxidación de un substrato en el organismo animal) juegan un importante papel en la regulación del balance energético (Trayhurn y col., 1982). El origen de este proceso continúa siendo materia de controversia, pareciendo hoy, que la naturaleza de la grasa de la dieta, resulta ser un factor de interés a considerar.

Empleando grasas marcadas, parece deducirse que los ácidos grasos poliinsaturados y los de cadena media, se oxidan como fuente de energía más rápidamente que lo hacen los saturados, siendo por tanto depositados en menor cantidad, pudiendo dar lugar a un incremento de la termogénesis inducida por la dieta (Mercer y Trayhurn, 1987; Su y Jones, 1993). La síntesis de ácidos grasos parece quedar inversamente relacionada con el grado de insaturación y longitud de la cadena de los mismos. En opinión de Su y Jones (1993), los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, son más fácilmente acilados, transformándose en triglicéridos que se depositan. Igualmente se conoce cómo la presencia de ácidos grasos poliinsaturados o de cadena media, dan lugar a un aumento en el depósito de proteína (Su y Jones, 1993).

La producción de calor asociada a la utilización de proteína, puede calcularse como la diferencia entre la ingesta de la correspondiente energía metabolizable (energía absorbida como proteína menos la energía de la orina) y, la energía retenida (energía retenida como proteína). El cálculo del calor asociado a la utilización en oxidación de la grasa, se produce de modo similar bajo el supuesto de que la grasa depositada es enteramente de origen dietético, resultando por tanto, la energía absorbida como grasa menos la retenida de la misma forma, igual al calor producido por oxidación de la grasa (Astrup y col., 2002).

2.7.- Alergia a las proteína de la leche

La leche de las distintas especies de rumiantes, bien directamente o en forma de productos derivados, constituye un alimento de singular importancia para el ser humano

durante toda su vida. Este alimento puede considerarse fuente de macronutrientes y micronutrientes, conteniendo además, un cierto número de compuestos activos que juegan un papel tanto nutritivo como de protección. Ya sea para su consumo directo o en forma de productos transformados, la leche de vaca es la más empleada en el mundo occidental, en razón de su mayor disponibilidad. De igual manera, uno de los principales problemas asociados a su consumo, sobre todo durante los primeros estadios de vida, reside en la reacción alérgica que a sus proteínas, con cierta frecuencia se produce, problema que se intenta solucionar sustituyendo en los alimentos lácteos infantiles, la proteína vacuna por distintos hidrolizados de la misma o, incluso, por proteínas de origen vegetal. En relación con esto, desde hace tiempo se conoce cómo el problema descrito, queda a veces solucionado sustituyendo simplemente, la leche de vaca por la de cabra, hecho que viene adjudicando a ésta última, un carácter hipoalergénico frente a la de vaca, aspecto aún en discusión.

Debido a la importancia del tema y dado que resulta ser uno de los abordados en la actualidad por nuestro grupo de trabajo, presentamos aquí una revisión referente a la alergia ocasionada por las proteínas de la leche de vaca, incluyendo junto a la definición de los principales conceptos al respecto necesarios, la información disponible en relación con el análisis de dicho tipo de alergia, así como la referente a los estudios sobre búsqueda de alternativas a su empleo, especialmente para la infancia, analizándose en este sentido, la información referente a la posible hipoalergenicidad que la leche de cabra podría poseer frente a la de vaca.

Reacciones adversas a un alimento

La Academia Americana de Alergia, Asma e Inmunología, elabora en el año 1984, un glosario de definiciones con objeto de unificar conceptos y no dar lugar a errores o confusiones al aplicar términos incorrectos (American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 1984). Dentro de dicho glosario se define como término más amplio, lo que se conoce como *reacción adversa a un alimento*: “respuesta clínica anormal que presentan determinados individuos y que se atribuye a la ingesta de un alimento o aditivo, que en

general resulta bien inocuo por la mayoría de los sujetos”. La *intolerancia alimentaria*, se define como: “la reacción adversa a un alimento, en cuya patogenia no interviene, o no se ha podido demostrar, un mecanismo inmunológico”. Por el contrario, la *alergia alimentaria*, se considera como: “una reacción adversa de patogenia inmunológica comprobada, que presenta un individuo tras la ingestión de un alimento”. Esta reacción se produce sólo en algunos sujetos previamente sensibilizados, pudiendo desencadenarse después de la toma de muy pequeñas cantidades del alimento en cuestión.

Las alergias son respuestas inmunes exageradas a antígenos extraños inofensivos (alérgenos) en individuos sensibilizados. La exposición inicial del individuo a estos alérgenos (polen, alimentos, ácaros, antibióticos, etc.), origina una respuesta inmune adaptativa, en la que se produce una activación de linfocitos T, que coordinan la síntesis de anticuerpos y la activación de distintos tipos celulares. Esta respuesta inicial lleva tiempo y normalmente no causa ningún síntoma clínico. Una vez producidos los anticuerpos o las células T que reaccionan con el alérgeno, cualquier exposición posterior al mismo, originará una reacción alérgica con diversos síntomas: desde la rinitis característica en la fiebre del heno o las reacciones asmáticas, hasta un choque anafiláctico.

Una vez que un individuo está sensibilizado, las reacciones alérgicas pueden agravarse con cada nueva reexposición al alérgeno, ya que va aumentando el número de linfocitos T y B, que reaccionan frente a esa sustancia. Al igual que ocurre con la respuesta inmune específica frente a patógenos, las reacciones alérgicas frente a sustancias inocuas, pueden originar respuestas de tipo humoral o celular, dependiendo del tipo de alérgeno y de su presentación a las células del sistema inmune. En este sentido, Coombs y Gell (1968), diferenciaron cuatro tipos de alergias (I, II, III y IV). Las tres primeras, mediadas por anticuerpos y la cuarta, mediada por células. A diferencia de lo que ocurre en la hipersensibilidad de tipo I, las de tipo II y III, tardan unas cuantas horas en producir síntomas tras la exposición al alérgeno. La de tipo IV, tiene una latencia superior a 24 h y de ahí que se denomine también de tipo retardado. Lo mismo le ocurre a la de tipo II, al ser rara su relación

con antígenos alimentarios, aunque ha sido demostrada en niños con intolerancia a la leche de vaca.

La Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica, publicó en 1995 (Brujizeel-Kooman y col., 1995) una clasificación de las reacciones adversas a un alimento, diferenciando dos grandes grupos, *reacciones tóxicas* y *no tóxicas*, según que la respuesta resulte independiente o no del individuo. Por *reacciones tóxicas* se entienden: “aquéllas que pueden afectar a cualquier individuo”, siendo las *no tóxicas*, “las que padecen solamente, los que presentan para ello una cierta predisposición”. Las no tóxicas en cuanto que pueden estar mediadas por mecanismos inmunológicos o no inmunológicos, constituirán una *reacción alérgica* o una *intolerancia alimentaria* (Brujizeel-Kooman y col., 1995). Por lo tanto, la alergia alimentaria es un caso particular de las posibles reacciones adversas que origina un alimento, quedando producida por una reacción de carácter inmunológico específica hacia dicho alimento (Ojeda Casas, 2001).

2.7.1.- Alergia a la proteína de la leche de vaca

Como indica Park (1994), bajo el consumo de cualquier alimento, el sujeto queda expuesto a numerosas sustancias de carácter antigénico, capaces de originar una respuesta inmunológica.

La alergia a las proteínas de la leche de vaca es una enfermedad frecuente en el niño, no quedando aún claros totalmente, los mecanismos etiológicos implicados. Un aumento en la absorción intestinal de antígenos, seguida de unas reacciones locales de carácter inmunológico, constituyen los factores determinantes de esta enfermedad (Walker, 1987).

Este tipo de alergia alimentaria, no afecta sólo durante la edad infantil sino que puede persistir en niños de más edad e incluso adultos (Heyman y Desjeux, 1992). La mayor parte de los niños menores de tres años presentan anticuerpos circulantes frente a la leche, llegando a mostrar, al menos en los países occidentales, el 7% de estos niños, algún síntoma de alergia frente a las proteínas lácteas (Park, 1994).

Muchos alimentos son capaces de producir síntomas de alergia, siendo la leche de vaca la causa más frecuente de alergia alimentaria, especialmente en los niños (Rosenblum y Rosenblum, 1952; Walker, 1965; Van der Horst, 1976; Firer y col., 1981; Robertson y col., 1982; Heyman y Desjeux, 1992; Podleski, 1992). Aparentemente, más de un mecanismo queda envuelto en la alergia a la leche, y más de uno se desarrolla en cada paciente, incluso bajo la existencia de una única manifestación clínica (Podleski, 1992), lo que según Park (1994), no deja de resultar difícil de entender.

Hablando de la patogenia de la alergia a un alimento, Park (1994) indica cómo al respecto se han propuesto dos mecanismos integrados, I: la absorción de un antígeno desde el intestino y, II: el desarrollo por parte de las células del individuo, de una respuesta inmune.

Absorción de antígenos desde el intestino

Bajo condiciones fisiológicas normales, una serie de macromoléculas tales como los antígenos alimentarios, están siendo constantemente absorbidos por el epitelio intestinal (Heyman y Desjeux, 1992), resultando difícil el cuantificar la cantidad exacta de proteínas que cruzan el epitelio intestinal, quedando en dicho proceso implicadas una serie de interacciones, las que suceden tanto antes como después del transporte a través del epitelio. Por medio de técnicas *in vitro*, este proceso ha podido ser medido (Marcon-Genty y col., 1989; Isolauri y col., 1990), proponiéndose para el mismo, dos vías diferentes. La vía principal resulta ser la degradación de la proteína en el lisosoma, proceso que no implica la hidrólisis total de la proteína, originándose en consecuencia, nuevos antígenos de peso molecular más bajo, que pueden interaccionar con las células inmunes (Heyman y col., 1982). En opinión de Park (1994), más del 90% de las proteínas que atraviesan la pared intestinal lo hacen de esta manera. La segunda vía por la que una proteína con carácter antigénico puede ser absorbida, es mediante su paso directo a través del intestino, vía de menor importancia que implica sólo el 10% del total (Heyman y Desjeux, 1992; Isolauri y col., 1990).

Respuesta inmune

La absorción de un antígeno alimentario, a través del intestino, estimula a las células del sistema inmune del individuo, dando lugar a la liberación de distintos mediadores, los que quedan envueltos en el mantenimiento de la alteración de la permeabilidad intestinal (Heyman y Desjeux, 1992). De acuerdo con el mecanismo inmunológico implicado, las reacciones alérgicas a un alimento pueden clasificarse en dos grandes grupos, según queden involucradas o no, las inmunoglobulinas G (IgG). El primer tipo de respuesta consiste en una reacción inmediata de hipersensibilidad. Como respuesta a la re-exposición a un alérgeno, anticuerpos específicos tipo IgG, se unen a basófilos, dando lugar a la liberación de mediadores como la histamina (Worthington y col., 1974; McClenathan y Walker, 1982; Podleski, 1992). Los mediadores se encuentran almacenados en las células de los tejidos corporales, liberándose cuando se produce el estímulo, actuando sobre determinados tejidos, causando vasodilatación, contracción muscular, secreción de mucus, etc. (McClenathan y Walker, 1982; Podleski, 1992), sucediendo igualmente, una estimulación de terminaciones nerviosas. Como manifestación patológica, las áreas afectadas muestran edemas, vasodilatación y eosinofilia.

El segundo tipo de mecanismo inmunológico, presenta distintas vías de actuación. Anticuerpos no del tipo IgG, reaccionan con el antígeno formando complejos, que a su vez, activan a un sistema complemento, causando inflamación y/o efectos citopatológicos (McClenathan y Walker, 1982). Otro mecanismo, probablemente no mediado inmunológicamente que se desarrolla en la alergia alimentaria, puede consistir en una toxicidad directa de la proteína en cuestión o de sus fragmentos. La hidrólisis de las proteínas absorbidas origina péptidos que podrían quedar implicados en la activación linfocitaria (Bland, 1987; Mayrhofer y Spargo, 1989; Heyman y Desjeux, 1992). En un determinado paciente, lo probable es que actúen simultáneamente distintos mecanismos, predominando uno de ellos y contribuyendo los demás a la reacción final (Heyman y Desjeux, 1992; Podleski, 1992).

Relación existente entre la alergia alimentaria y la permeabilidad intestinal

En su reciente estudio de revisión, Park y Haenlein (2006), analizan este aspecto de las reacciones de alergia alimentaria. Estos autores comentan cómo usando un modelo experimental animal, en los casos de existencia de una hipersensibilidad inmediata a la proteína de un alimento (reacción mediada por la liberación de IgG), se ha demostrado que el estímulo creado por la sustancia antigénica, conduce a un aumento en la permeabilidad intestinal frente a las proteínas presentes (Bloch y Walker, 1981; Roberts y col., 1981; Heyman y Desjeux, 1992). Heyman y colaboradores (1990), demostraron que cobayas que estaban sensibilizadas frente a las proteínas de la leche, presentaban frente a determinadas macromoléculas marcadoras, una permeabilidad más alta que la que se detectaba en los animales controles. Igualmente, un estímulo originado *in vitro*, por β -lactoglobulina, aumentaba esta permeabilidad. Estos mismos autores, en otro estudio, obtienen igualmente, un incremento de la permeabilidad intestinal en una biopsia del yeyuno de un niño que presentaba una reacción alérgica a la leche de vaca (Heyman y col., 1988), efecto que desaparecía después de excluir dicho alimento de la dieta durante varios meses. Junto a esto, diferentes estudios llevados a cabo parecen indicar, que la permeabilidad intestinal que se produce durante una alergia a la leche de vaca, no es la causa de dicha alergia, sino más bien, consecuencia de una respuesta inmune anormal (Heyman y Desjeux, 1992).

La secreción intestinal de electrolitos aumenta durante la hipersensibilidad inmediata. Sin embargo, la activación celular que se produce, es debida a la secreción de iones Cl^- , secreción inducida por la histamina, serotonina, metabolitos del ácido araquidónico, factor de actividad plaquetaria, neuromediadores, etc. (Wasserman y col., 1988; Perdue y col., 1990). Distintos resultados de carácter experimental han puesto de manifiesto, la estrecha relación existente entre la actividad celular y el sistema nervioso intestinal, lo que puede dar lugar a una amplificación de la disfunción intestinal de carácter anafiláctico (Stead y col., 1989; Perdue y col., 1990). De acuerdo con esto se sugiere, que todos los mediadores citados, pueden llegar a estimular la absorción de macromoléculas proteicas.

La alergia alimentaria puede también manifestarse de una manera más tardía, hipersensibilidad retardada, a través de la activación de los linfocitos T, los que son capaces de liberar linfoquinas, interleuquinas (ILs), factor de necrosis tumoral e interferón- γ (γ -IFN), los que igualmente, pueden alterar la permeabilidad intestinal (Heyman y Desjeux, 1992).

2.7.2.- Proteínas lácteas con poder antigénico

En relación con la composición proteica de la leche de vaca, se conoce cómo ésta presenta unos 30 g/kg de proteínas totales. De esta cantidad, sobre el 80% son caseínas, quedando constituido el 20% restante por las proteínas séricas. De manera general, las caseínas de la leche de vaca se definen, como las fracciones proteicas que precipitan a pH=4,6. Las caseínas existentes en este tipo de leche son las α_{s1} , α_{s2} , β y κ , quedando constituidas las séricas especialmente, por la α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina e inmunoglobulinas. Las proteínas lácteas que pueden actuar como antígenos, desencadenando una reacción alérgica, parecen ser principalmente las α_{s1} -caseína y β -lactoglobulina.

Boza Puerta (1992) indica cómo tanto la α_{s1} -caseína y la β -lactoglobulina, no existen en la leche humana, donde la mayoritaria resulta ser la β -caseína, si bien su composición parece ser bastante diferente de la de vaca (Otani y Hosono, 1989). En una reciente revisión de este tema Park y Haenlein (2006) indican, cómo los datos de prevalencia a la alergia por leche de vaca no pueden considerarse exactos, ya que los resultados de los distintos métodos de diagnóstico existentes, son difíciles de interpretar dada la ausencia de antígenos estandarizados (Kaiser, 1990; Haenlein, 2004) y porque la leche de vaca contiene 18 proteínas diferentes frente a las que en experimentos con animales, se ha demostrado la formación de anticuerpos (Hanson y Mannson, 1961). Igualmente se indica cómo al no estar presente en la leche humana, la β -lactoglobulina se considera la fracción proteica de la leche más ofensiva desde el punto de vista alergénico, no encontrándose, sin embargo, en diferentes estudios comparativos realizados, diferencias entre la alergenicidad de la β -lactoglobulina y caseínas (Buergin-Wolff y col., 1980; Taylor, 1986). Park y Haenlein (2006), analizan los

resultados encontrados en distintos estudios llevados a cabo tanto en lactantes, niños y adultos, como en distintos modelos animales, deduciendo cómo la reacción alérgica parece poder ser producida tanto por los distintos tipos de caseínas, especialmente la α_s -caseína y β -caseína, como por las distintas proteínas séricas, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina e inmunoglobulinas (Firer y col., 1981; Bahna, 1991). Estos autores (Park y Haenlein, 2006), comentan unos resultados obtenidos en 21 adultos y 13 niños, en los que se suponía de acuerdo con la sintomatología correspondiente, la existencia de alergia a la leche de vaca (Kaiser, 1990). Diez de los 13 niños mostraron reacciones positivas frente a cinco de los 21 adultos. De estos cinco adultos, sólo uno presentó títulos altos de IgG, frente a α -lactoalbúmina, mientras que siete de los niños lo hacían frente a todas o algunas de las cinco principales fracciones proteicas. En un niño de dos años y medio, el título más alto se encontró frente a la α -caseína y β -caseína. De manera general, se detectaban títulos de IgG más altos frente a caseínas que frente a proteínas séricas (Kaiser, 1990).

En otro caso, en un estudio con 45 niños que mostraban distintos síntomas gastrointestinales, dérmicos y respiratorios, Bahna (1991), estimula oralmente con leche entera de vaca, determinando la respuesta cutánea, bajo suplementación intradérmica con leche entera, caseína y α -lactoalbúmina. El test de prueba cutánea resultó positivo en 23 de los niños investigados. La concordancia entre los resultados obtenidos en relación a la respuesta al estímulo producido con leche entera y, el test de prueba cutánea en el que se suplementaba con leche de vaca, resultó ser de un 48%, con caseína un 51% y, con α -lactoalbúmina un 31%. Pahud y colaboradores (1985) observaron en cobayas sensibilizados oralmente con suero de leche de vaca desmineralizado, una anafilaxia cutánea más intensa, frente a la β -lactoglobulina, resultando dicha reacción menor, frente a las otras proteínas del suero. El suero empleado, perdía su capacidad sensibilizadora después de ser hidrolizado con tripsina.

2.7.3.- Síntomas de una alergia alimentaria

Las manifestaciones clínicas más comunes a cualquier tipo de alergia alimentaria, son de carácter gastrointestinal, dérmico y respiratorio. En los pacientes afectados por una alergia a la leche de vaca, los síntomas gastrointestinales se manifiestan generalmente en un 50-75%, los respiratorios se presentan sólo en un 10-30%, mientras que los dérmicos, lo hacen en un 50% o más (Bahna y Gandhi, 1983a).

El choque anafiláctico representa la reacción más severa que puede originarse como consecuencia de una alergia alimentaria, la que consiste en una respuesta sistémica generalizada que puede conducir, si no se trata de inmediato, incluso a la muerte (Taylor, 1985). Ellis (1979) indica, que un choque de esta naturaleza, se produce raramente como consecuencia de una alergia alimentaria, habiendo sido, sin embargo, observado en distintos casos de alergia a la leche de vaca.

Park y Haenlein (2006) comentan cómo la manifestación gastrointestinal más frecuente que se produce en los casos de alergia a un alimento, es diarrea, vómitos, dolores abdominales y náuseas. Los síntomas dermatológicos incluyen: urticaria, dermatitis, eczema y angioedema (Taylor, 1985). La alergia alimentaria está implicada en la etiología de la urticaria crónica aunque en opinión de Park y Haenlein (2006), se necesitan en este sentido estudios, que pongan lo dicho claramente de manifiesto.

Los síntomas respiratorios incluyen rinitis y asma, resultando, como ya se ha dicho, menos frecuentes que los gastrointestinales, en los casos de alergias alimentarias. Distintos estudios han llegado a demostrar cómo diferentes casos de asma, quedaban asociados a una alergia por consumo de determinados alimentos, entre ellos la leche. La rinitis es el síntoma respiratorio más frecuente en estos casos, habiéndose detectado de manera crónica en algunos niños con alergia a la leche de vaca (Heiner, 1983).

Junto a lo indicado, existen otros síntomas que pueden ser atribuidos a una alergia alimentaria, aunque sus mecanismos inmunológicos no resulten claros, ni hayan sido

constatados. Estos síntomas incluyen migraña, desórdenes del comportamiento, otitis media, síndrome de muerte súbita, fibrosis quística, enfermedad de Crohn, etc. (Park y Haenlein, 2006).

2.7.4.- Alternativas al consumo de leche de vaca en los casos de alergia a su proteína

La primera descripción de una alergia a las proteínas de la leche de vaca, se debe a Hamburger, quién detectó en 1901 una reacción aguda en un niño que consumía este tipo de leche. Hoy día se dispone de una amplia información según la cual en determinadas circunstancias, como en los síndromes de malabsorción, las proteínas de la leche de vaca pueden producir problemas de hipersensibilidad, no sólo en lactantes, sino también en niños y adultos. Como consecuencia de esto, desde hace tiempo, se vienen llevando a cabo diferentes estudios tendentes a ofrecer alternativas al empleo de este tipo de leche.

De distinta manera se viene intentando reducir la alergenicidad de las proteínas de la leche de vaca. El-Agamy (2007) revisa este aspecto, señalando en un principio los intentos practicados por medio de la aplicación de calor. En este sentido, lo primero observado fue cómo la resistencia al calor, difiere marcadamente entre las distintas fracciones proteicas, resultando la α -caseína la más estable, la β -seroalbúmina la menos y presentando la β -lactoglobulina una resistencia intermedia (Bahna y Gandhi, 1983b); resultados todos deducidos según ensayos llevados a cabo en diferentes modelos experimentales. En este sentido, El-Agamy (2007) comenta cómo en estos casos junto a una menor alergenicidad, podría derivarse, de acuerdo al tratamiento, una caída en el valor nutritivo de la proteína.

Otro proceso practicado con objeto de reducir la alergenicidad a las proteínas de la leche de vaca, ha sido la aplicación de tratamientos enzimáticos, encontrándose que los productos resultantes, presentan unas características organolépticas que determinan en muchas ocasiones, un rechazo por parte del consumidor. Además en estos casos no se descarta que el proceso de proteolisis no dé lugar a nuevas sustancias con carácter antigénico. Por ejemplo, en este sentido se ha deducido que cuando la β -lactoglobulina se trataba con tripsina, retenía

su propia antigenicidad, ya que los péptidos originados eran capaces de unirse específicamente con las IgG humanas (Selo y col., 1999).

Sin duda alguna, la alternativa más comúnmente utilizada en los casos de alergia infantil a las proteínas de la leche de vaca, es la del empleo de hidrolizados de las mismas, así como de la proteína de soja. Las caseínas, proteínas séricas, así como proteínas de soja, una vez sometidas a un proceso de hidrólisis por medio de enzimas proteolíticos, dan lugar a los hidrolizados correspondientes, con los que se pretende sustituir las proteínas originales en las fórmulas infantiles. Los productos así conseguidos se clasifican de acuerdo con el grado de hidrólisis proteica llevado a cabo. Según El-Algamy (2007), distintos hidrolizados de caseínas se vienen utilizando desde hace casi 50 años, mientras que los hidrolizados de las proteínas séricas, hay que considerarlas alternativas más recientes. Ambos tipos de proteínas parecen alcanzar un mismo grado de tolerancia clínica (Martín-Esteban y col., 1998).

Estos hidrolizados presentan por lo general, un sabor no agradable, que puede ser amargo, siendo sin embargo recomendados como la primera alternativa en los casos de alergia a la leche de vaca durante la lactancia (Terracciano y col., 2002). Distintos estudios empleando diferentes modelos experimentales, han analizado no sólo la alergenicidad sino también el valor nutritivo de estos hidrolizados, tanto de las caseínas como de las proteínas séricas de la leche de vaca (Boza y col., 1994, 1995a, b, c). En este sentido, se indica cómo uno de los aspectos que más pueden limitar el valor nutritivo de un hidrolizado con vistas a su empleo en las fórmulas lácteas infantiles, es la reacción de Maillard, la que de acuerdo a los cambios introducidos en la composición de las proteínas, podría llevarse a cabo en el producto (O'Brien, 1995).

Según El-Agamy (2007), las fórmulas infantiles basadas en proteína de soja presentan desde un punto de vista nutritivo, un valor equivalente a las basadas en hidrolizados de leche de vaca, resultando a la vez, más palatables. Sin embargo, no son recomendables para todos los casos de alergia a la leche de vaca, ya que se ha comprobado que sobre un 17-47% de los niños con alergia a la leche de vaca, pueden mostrar algún tipo de reacción adversa a la soja.

Dado que se conoce que la composición proteica de una leche juega un papel esencial en la posible alergenicidad de la misma, y dado que igualmente se sabe, cómo la composición de las diferentes fracciones proteicas lácteas resultan bastante similares entre las distintas especies, últimamente se empieza a considerar la importancia que en la alergia a la leche de vaca tendría, la razón existente entre la proporción de caseína y proteína sérica existente. Lara-Villoslada y colaboradores (2005) investigan en un modelo experimental esta cuestión, utilizando una leche de vaca normal (relación caseína/proteínas séricas $\approx 80/20$) frente a otra en la que la relación entre caseínas/proteínas séricas resultaba sensiblemente menor (40/60), obteniendo resultados indicativos de existir bajo ingesta de la leche con una menor proporción de caseína, una menor respuesta alérgica, concluyendo sobre cómo esta vía de cambios podría resultar interesante con vistas a reducir la alergia que la leche de vaca en ciertos casos presenta.

Junto a lo indicado, con el fin de llegar a disponer de una alternativa a la leche de vaca en los casos de alergia a su proteína, se empieza a considerar la posibilidad de lograrlo mediante la manipulación genética. En opinión de Boland y colaboradores (2001), esta manipulación tanto para el caso de la β -lactoglobulina como para las distintas caseínas, conseguiría lo que podría llamarse una humanización de la leche de vaca. Dado que la β -lactoglobulina es una proteína no existente en la leche humana y a la que se le atribuye uno de los más altos poderes antigénicos, la manipulación consistiría en la introducción en el genoma bovino de un gen que anulara la síntesis de dicha proteína. Para el caso de las caseínas, el cambio necesario sería la introducción de los genes humanos que rigen la síntesis de dichas proteínas, creando una secuencia de las mismas idéntica a la existente en la leche humana. Boland y colaboradores (2001) comentan, cómo la expresión de una β -caseína idéntica a la humana, ha sido conseguida por medio de un gen bacteriano, logrando de esta manera una leche hipoalérgica, pues si bien la β -caseína es la caseína más frecuente en la leche humana, su composición resulta diferente a la bovina.

2.7.5.- La leche de cabra como posible alternativa en los casos de alergia a la de vaca

Como indican Boza y Sanz Sampelayo (1984), las observaciones arqueológicas muestran que la cabra fue uno de los primeros animales que el hombre domesticó (French, 1970) y seguramente el único que le proporcionó leche en la antigüedad (Sanz Egaña, 1942; Hawkes, 1977). Esta especie se extendió por todo el mundo y ocupó zonas geográficas más amplias que cualquier otro animal doméstico. Su pequeña talla, docilidad y productividad tuvieron que hacerla muy apreciada por el hombre primitivo (Boza y Sanz Sampelayo, 1984). Tormo y colaboradores (2004) comentan cómo la leche de cabra juega un papel importante en la alimentación infantil en distintos países, tanto anglosajones, incluyendo Estados Unidos, de Asia, del Magreb y del Tercer Mundo. Haenlein (2004), sin duda uno de los investigadores que más se ha dedicado al estudio de la cabra, sobre todo al análisis de la calidad de sus producciones, comenta en una de sus más recientes revisiones, cómo existen numerosas referencias en relación con los beneficios que pueden derivarse del consumo de la leche de cabra, información recogida en distintas publicaciones de carácter divulgativo, siendo en su opinión, aún escasos los estudios al respecto, recogidos en revistas científicas especializadas. Concretamente, cita cómo en The International Dairy Federation Nutrition Week, del año 2000, reunión celebrada en Irlanda, no hubo ninguna comunicación ni presentación en forma de póster, sobre el papel de la leche de cabra en la nutrición del ser humano, como tampoco la hubo en otros congresos relacionados con la producción láctea. Actualmente se viene celebrando cada cuatro años, una reunión sumamente interesante, La Conferencia Internacional sobre la Cabra, habiendo correspondido al 2004, la VIII de estas reuniones, en las que se abordan todos los temas referentes a la explotación de esta especie en todo el mundo. En la V de estas conferencias, celebrada en 1992 en la India, se organiza por primera vez un simposio referente al papel de la leche y carne de cabra en la nutrición humana, analizándose aspectos tan interesantes como: “La leche de cabra en la nutrición infantil” (Puranik, 1992) y, “Aspectos nutricionales de la leche de cabra y sus productos” (Chandan y col., 1992), trabajos en los que se analiza el empleo de este tipo de leche en la alimentación

infantil en los países del Tercer Mundo, concretamente en India (Puranik, 1992) o donde después de comparar su composición con la que presenta bien la leche de vaca o la humana, y describirse los principales productos lácteos en base a ella elaborados en todo el mundo, se termina considerando el beneficio que se deriva en los casos de alergia a la leche de vaca, mediante su sustitución por la de cabra. En este sentido, los autores del trabajo, Chandan y colaboradores (1992), indican cómo desde hace bastante tiempo, se viene recomendando el uso de leche de cabra evaporada o en polvo, en las fórmulas infantiles (Luke y Keith, 1982; Juntunen y Ali-Yrkko, 1983; Taitz y Armitage, 1984; Coveney y Darnton-Hill, 1985). Los autores terminan su estudio comentando que dado que la leche de cabra presenta un contenido bajo en α_{S1} -caseína, es lógico suponer que los niños sensibles a dicha proteína de la leche de vaca, presenten una alta tolerancia a la de cabra, la que por lo general, contiene niveles más bajos de esa proteína.

Park y Haenlein (2006), nos dicen cómo el empleo de leche de cabra como alimento hipoalergénico respecto de la leche de vaca, ha sido citado repetidas veces para casos en los que especialmente niños, mostraban reacciones adversas frente al empleo de leche de vaca, como eczemas, asma, catarro crónico, migrañas, colitis, úlcera gástrica, dolor abdominal, etc. (Walker, 1965; Taitz y Armitage, 1984; Haenlein, 2004). Niños que presentaban alergia a la leche de vaca y no a la de cabra, lo hacían igualmente, al queso de leche de vaca y no al de cabra (Soothill, 1987). De la misma manera se cita, que otros individuos afectados de una eosinofilia como consecuencia de una alergia gástrica, mostraban una mejoría sensible, después de administrárseles leche de cabra (Rosenblum y Rosenblum, 1952). Maszewska-Kuzniarz y Sonta-Jakimaczyk (1973) indican del mismo modo, que en un caso de alergia crónica por consumo de una fórmula infantil basada en leche de vaca, se lograba curar al cambiar a leche de cabra.

Park y Haenlein (2006), igualmente comentan, lo publicado por Brenneman (1978), autor que cita que aproximadamente, un 40% de los pacientes sensibles a las proteínas de la leche de vaca, toleran las de cabra. Walker (1965), nos dice que sólo un 1% de los niños que resultan alérgicos a la leche de vaca no toleran bien la de cabra. Del mismo modo se informa

que la lactoalbúmina de la leche de cabra presenta una reacción cutánea diferente de la de vaca (Cornell y col., 1971). Perlman (1977) encuentra diferencias en cuanto a las reacciones cutáneas debidas a las distintas proteínas lácteas con poder alergénico, según se trate de leche de vaca o cabra. Los resultados al respecto obtenidos muestran, cómo ciertas proteínas bovinas dan lugar a una mayor incidencia positiva en los test de sensibilidad cutánea, frente a las de origen caprino.

En cuanto a la posible alergenicidad cruzada que las proteínas de la leche de vaca y cabra pueden presentar, la información disponible resulta aún inconsistente (Podleski, 1992). Hace tiempo por medio de análisis electroforéticos, se puso de manifiesto la existencia de una cierta reactividad cruzada entre las proteínas de la leche de vaca y cabra (Saperstein, 1960; Parkash y Jenness, 1968; Saperstein, 1974; McClenathan y Walker, 1982). Sin embargo, en opinión de Park y Haenlein (2006), desde un punto de vista clínico, pocas veces se ha demostrado que la leche de cabra no resulte adecuada para los pacientes afectados de alergia a la de vaca, en razón de la reactividad cruzada existente entre los dos tipos de proteínas.

No obstante, tras todo lo indicado sobre la posible hipoalergenicidad de la leche de cabra frente a la de vaca, la bibliografía hoy existente no siempre se manifiesta en este sentido. De manera concreta, Spuerger y colaboradores (1997), desaconsejan en los casos de alergia, el sustituir la leche de vaca por la de cabra, manifestando Sabbah y colaboradores (1997) que sólo un número reducido de pacientes alérgicos a la leche de vaca, toleraban la de cabra. En este sentido resulta de interés indicar que en distintas revistas médicas, se describen casos de un paciente único, niño o adulto, que tolerando bien la leche de vaca presentaba alergia a la de cabra (Umpiérrez y col., 1999; Álvarez Lombardero, 2002; Muñoz Martín y col., 2004). Dada la complejidad de la respuesta inmune, el interés de la descripción de estos casos concretos, residiría en nuestra opinión, no sólo en la manifestación de la posibilidad de alergia a la leche de cabra frente a la de vaca, sino también, en la rareza de los casos frente a lo que al respecto, va siendo cada vez más admitido. Además, la consideración de que la leche de cabra resulta hipoalergénica frente a la de vaca, no niega su posible alergenicidad, lo

que por otro lado y en función de la similitud entre las fracciones proteicas de ambos alimentos, resulta lógico suponer.

Actualmente, los estudios tendentes a determinar la posible hipoalergenicidad de la leche de cabra frente a la de vaca, muestran dos direcciones diferentes. En primer lugar, se intenta definir comparativamente la alergenicidad y reactividad cruzada de las proteínas de ambos tipos de leche, utilizando distintos modelos experimentales, aplicando las técnicas de alto poder resolutivo hoy disponibles. En segundo lugar, lo que se pretende es llegar a establecer frente a la de vaca, la alergenicidad de distintos tipos de leche de cabra en razón de su diferente composición proteica.

De acuerdo con la primera vía indicada, Lara-Villoslada y colaboradores (2004), determinan en ratones, la alergenicidad tanto de una leche de vaca como de cabra. Los animales se sensibilizaban intragástricamente con ambos tipos de leche, presentando los sensibilizados con leche de vaca ciertas reacciones clínicas más intensas. Junto a esto, en el suero de estos mismos animales, se detectaban niveles más altos de inmunoglobulinas IgG1 así como de histamina. Otro diferente resultado obtenido según tipo de leche, fue el del nivel de citoquinas, determinándose igualmente, en los ratones sensibilizados con leche de vaca, un aumento significativo de los niveles de IL-4. Los autores concluyen indicando cómo en ratones al destete, la proteína de la leche de cabra resultaba menos alergénica que la de vaca. A pesar de esto, en su opinión, se necesitan abordar otros aspectos con objeto de poner claramente de manifiesto si la leche de cabra puede considerarse una alternativa apropiada a la de vaca, sobre todo para las fórmulas lácteas infantiles.

En nuestro grupo de trabajo, se lleva a cabo un proyecto de investigación dirigido a caracterizar desde un punto de vista tanto nutritivo como inmunológico, la leche de cabra frente a la de vaca. Utilizando como modelo experimental el cobaya, animal indicado como el más adecuado para los estudios de alergenicidad, hemos llevado a cabo dos ensayos *in vivo*, utilizando como agente inmunizante un pool de leche de cabra y vaca. Tras la inmunización oral de los animales, se procedió a realizar la prueba de anafilaxia sistémica, muriendo el

50% de los animales sensibilizados con leche de cabra (shock anafiláctico), frente al 75% de los que habían consumido la de vaca. Los animales desarrollaron anticuerpos sistémicos (IgG1) frente a las proteínas de ambos tipos de leche, quedando los niveles correspondientes determinados por ELISA, entre unos títulos iguales a 1/8 y 1/512. Para la segunda prueba, determinación de anafilaxia cutánea pasiva, la sensibilización se realizó utilizando un pool de sueros procedentes de los animales que presentaron shock anafiláctico en el ensayo de anafilaxia sistémica. En este caso, se obtuvo el mismo número de animales positivos dentro de cada tipo de leche, si bien en los inoculados con el suero que presentaban anticuerpos frente a las proteínas de la leche de cabra, la reacción resultaba menos intensa y el diámetro de extravasación menor (Rodríguez Osorio y col., 2006). Estos resultados ponen nuevamente de manifiesto cómo la leche de cabra resulta hipoalergénica frente a la de vaca.

En segundo lugar, en relación con la vía indicada resulta interesante manifestar que como indica Haenlein (2004), el polimorfismo genético existente determina una gran diversidad en la composición proteica de la leche, tanto en relación con las caseínas como proteínas séricas, lo que hace aún más complejo el problema asociado a la alergenicidad de las proteínas de la leche de vaca, necesiéndose en cada caso, identificar a la proteína o proteínas responsables de la reacción alérgica. Sin embargo, últimamente se ha manifestado cómo esta diversidad genética en cuanto a la composición proteica de la leche, podría ser una ayuda con el fin de identificar qué proteína, es la que actúa como alérgeno. Bevilacqua y colaboradores (2000, 2001) plantean por primera vez el supuesto de que la alergenicidad de la leche de cabra podría variar en razón de ciertos aspectos específicos ligados a la composición de su proteína, aspectos que quedarían establecidos de acuerdo con la variedad genética animal, concretamente según el polimorfismo asociado al locus de la α_{S1} -caseína, fracción presente siempre en la leche de vaca y cuyo nivel en la de cabra, puede variar considerablemente e incluso resultar nulo. En efecto, el gen mayor de la α_{S1} -caseína, presenta en la cabra un inusual elevado polimorfismo genético, con 18 formas alélicas (Sacchi y col., 2005), aspecto que ha sido ampliamente estudiado desde los años 80 (Boulangier y col., 1984). Grosclaude y colaboradores (1987), analizaron el efecto de los diferentes alelos sobre

el nivel de síntesis de α_{S1} -caseína en razas caprinas francesas, Alpina y Saanen, clasificando los siete alelos entonces conocidos, en cuatro grupos: los alelos A, B y C, con un nivel de síntesis alto (3,6 g/l), el alelo E, con un efecto intermedio (1,6 g/l), el alelo F con un nivel de síntesis bajo (0,6 g/l) y el alelo nulo, sin presencia de α_{S1} -caseína en la leche.

Sabemos que la sustitución de la leche de vaca por la de cabra en los casos de alergenidad a la primera, demuestra que en un 40% de los casos, los sujetos presentan una tolerancia normal a la proteína de la nueva leche. Sobre los motivos que determinan que dicha sustitución no funcione en un 100%, empieza hoy a pensarse, como hemos dicho, en la importancia que al respecto puede tener la composición de la proteína láctea, en razón del polimorfismo genético asociado a la misma. Si lo que se pretende es hacer cambiar la composición de la proteína de la leche de vaca por la de cabra, sería lógico tener en cuenta que la leche de cabra más diferente de la de vaca en razón de su composición proteica, sería la que presentara un nivel nulo de α_{S1} -caseína. En este sentido Bevilacqua y colaboradores (2000, 2001) investigan en cobayas la alergenidad de una leche de vaca frente a diferentes tipos de leche de cabra en razón de su composición proteica. De los resultados obtenidos los autores indican que las discrepancias encontradas a nivel clínico sobre la efectividad de sustituir la leche de vaca por la de cabra en los casos de alergia a la primera, podrían deberse al polimorfismo genético asociado a los niveles de α_{S1} -caseína. Los animales utilizados mostraron una reacción alérgica a la leche de cabra que presentaba en su composición la fracción α_{S1} -caseína, similar a la originada por la de vaca. Por el contrario, los animales que habían consumido la leche de cabra que en vez de α_{S1} -caseína contenía α_{S2} -caseína, manifestaron una reacción alérgica sólo en el 40% de los casos, lo que en opinión de los autores apuntaría a considerar a la leche de cabra carente de α_{S1} -caseína, como hipoalérgica respecto de otros tipos de leche de cabra. En estos estudios igualmente se comenta cómo la más alta digestibilidad que la proteína de la leche de cabra carente en α_{S1} -caseína muestra frente a la de otros tipos de leche de esta misma especie, podría ser la causa de su menor capacidad sensibilizadora (Bevilacqua y col., 2000, 2001).

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Estudio del valor nutritivo de la leche de cabra y vaca. Utilización de su proteína y energía

3.1.1.- Animales y dietas

Con el fin de cumplir el objetivo propuesto, se llevaron a cabo unos ensayos de alimentación y sacrificio, utilizándose 40 ratas al destete (21 días de vida), machos, de raza Wistar (Harlan Interfama Ibérica, S.A.) con un peso inicial de 40 ± 2 g. Ocho de estos animales se sacrificaban nada más llegar al laboratorio, formándose con el resto cuatro lotes de ocho animales, los que se mantenían en células individuales de metabolismo, dentro de una cámara ecológica (21-24°C de temperatura; 50-60% H.R.; 12h diarias de luz/oscuridad), durante cuatro semanas, siendo igualmente sacrificados el último día de este período.

Cada uno de los cuatro lotes de animales últimamente descritos, se alimentaban en base a una dieta diferente. Lote 1: dieta cuya proteína y grasa procedía de leche de cabra (D1); Lote 2: dieta cuya proteína procedía de leche de cabra y grasa de vaca (D2); Lote 3: dieta cuya proteína y grasa procedía de leche de vaca (D3) y, Lote 4: dieta cuya proteína procedía de leche de vaca y grasa de leche de cabra (D4). La fuente de proteína de cada dieta era una leche en polvo desnatada, bien de cabra (Lácteas Cobreros, Zamora), o vaca (Puleva, S.A., Granada), presentándose en la Tabla 1, la composición química de las mismas, en la Tabla 2, la del perfil en aminoácidos de su proteína, en la Tabla 3, la de su contenido en minerales y en la Tabla 4, la de su composición en fracciones proteínicas. La fuente de grasa de las distintas dietas, era nata de leche de cabra (Lácteas Cobreros, Zamora) o mantequilla de leche de vaca (Puleva, S.A., Granada). La composición en ácidos grasos de esta nata y mantequilla, se recogen en la Tabla 5.

Tabla 1.- Composición química de la leche desnatada de cabra y vaca

	Leche de cabra (% MS)	Leche de vaca (% MS)
MS	94,24	94,17
MO	91,19	90,96
Proteína	29,35	34,94
Grasa	3,92	0,59
Lactosa	57,93	55,43
Minerales	8,81	9,04

Tabla 2.- Composición aminoacídica (% AA) de la proteína de la leche desnatada de cabra y vaca

	Leche de cabra	Leche de vaca	Diferencia (%) ¹
Aminoácidos esenciales			
Triptófano	0,904	0,966	-6,4
Treonina	4,156	4,063	+2,3
Isoleucina	4,362	4,502	-3,1
Leucina	9,513	9,348	+1,8
Lisina	9,241	8,884	+4,0
Metionina	2,206	2,456	-10,2
Cisteína	0,904	0,814	+11,1
Fenilalanina	4,872	4,689	+3,9
Tirosina	4,449	5,633	-21,0
Valina	5,617	5,200	+8,0
Total	46,224	46,555	
Aminoácidos no esenciales			
Arginina	3,726	4,016	
Histidina	3,248	3,276	
Alanina	3,367	3,373	
Ácido aspártico	7,151	7,527	
Ácido glutámico	20,696	19,455	+6,2
Glicina	1,639	1,728	
Prolina	9,379	8,879	
Serina	4,583	5,186	

¹Diferencia (%): Diferencia entre la proteína de leche de cabra y vaca ([valor leche cabra - valor leche vaca/valor leche vaca] x 100)

Tabla 3.- Fracciones proteínicas de la proteína de la leche desnatada de cabra y vaca

	Leche de cabra	Leche de vaca
Caseína (CN; % proteína)	78,7	84,4
α_{S1} -CN (% CN)	22,3	34,7
α_{S2} -CN (% CN)	12,9	7,8
Proteínas séricas (% proteína)	21,3	15,6

Tabla 4.- Composición mineral (mg/kg MS) de la leche desnatada de cabra y vaca

	Leche de cabra	Leche de vaca
Calcio	9713	9379
Fósforo	9743	7851
Magnesio	1136	866
Hierro	10,18	9,71
Cobre	2,47	1,32
Zinc	34,21	50,07

Tabla 5.- Perfil en ácidos grasos (%) de la grasa de la nata de leche de cabra y mantequilla de leche de vaca

	Leche de cabra	Leche de vaca	Diferencia (%) ¹
C4:0	2,28	5,68	
C6:0	2,67	3,38	
C8:0	3,14	1,87	
C10:0	10,96	3,88	
C11:0	0,12	0,07	
C12:0	5,44	3,93	+38,4
C14:0	11,43	11,31	+1,1
C14:1	0,18	0,25	
C15:0	0,83	1,11	
C15:1	0,23	0,24	
C16:0	27,37	30,83	-11,2
C16:1	0,78	1,47	
C16:2 n-4	0,12	0,05	
C17:0	0,53	0,55	
C17:1	0,28	0,25	
C18:0	7,89	9,84	
C18:1 n-9, <i>trans</i>	-	1,59	
C18:1 n-9, <i>cis</i>	21,23	19,75	
C18:2 n-6	2,78	2,50	+11,2
CLA n-7, (<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11)	0,29	0,51	
CLA n-6, (<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12)	0,07	0,04	
CLA n-7, (<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -11)	0,02	-	
CLA n-5, (<i>cis</i> -11, <i>trans</i> -13)	0,33	-	
CLA total	0,71	0,55	+29,1
C18: 3 n-3	0,52	0,33	+57,6
C20:0	0,19	0,13	
C20:1 n-9	-	0,09	
C20:2 n-6	0,03	0,11	
C20:3 n-6	-	0,05	
C21:0	0,05	0,02	
C22:0	0,18	0,15	
C23:0	0,02	0,02	
C24:0	0,02	0,02	
C24:1 n-9	0,02	-	
Ácidos grasos cadena media (C6-C14)	33,94	24,69	+37,5
Ácidos grasos saturados	73,12	72,77	+0,5
Ácidos grasos monoinsaturados	22,72	23,64	-3,9
Ácidos grasos poliinsaturados	4,16	3,59	+15,9
Ácidos grasos piliinsaturados n-6	2,88	2,70	+6,7
Ácidos grasos piliinsaturados n-3	0,52	0,33	+57,6
Ácidos grasos piliinsaturados n-6/n-3	5,54	8,18	

¹Diferencia (%): Diferencia entre la grasa de leche de cabra y vaca ([valor de leche cabra – valor de leche vaca/valor de leche vaca] x 100)

Tabla 6.- Composición en ingredientes (%) de las dietas experimentales

	Dietas con proteína de leche de cabra y grasa de leche de cabra o vaca	Dietas con proteína de leche de vaca y grasa de leche de vaca o cabra
Leche en polvo desnatada	33,01	26,72
Grasa	8,85	9,86
Celulosa	5,00	5,00
Almidón	38,18	42,32
Sacarosa	10,46	11,60
Complemento mineral	3,50	3,50
Complemento vitamínico	1,00	1,00

Todas las dietas se elaboraron con el fin de contener un 10% tanto de proteína (UNU, 1980) como de grasa (Alfárez y col., 2001). De acuerdo con la composición química de la leche desnatada de cabra y vaca, se tomaba de cada una de ellas la cantidad necesaria para aportar el contenido en proteína indicado. Dado que cada leche desnatada presentaba una pequeña cantidad de grasa, la necesaria a aportar, se completaba, en cada caso, con grasa pura obtenida a partir de la nata o mantequilla. Para ello, se partía de cantidades de éstas, fundidas a b.m. centrifugándose en centrífuga refrigerada (Hetticj; Universal 30 RF, Alemania), a 4°C y 4.000 r.p.m. durante 15 minutos, separándose la fracción sobrenadante constituida exclusivamente por la grasa. Igualmente, en cada dieta se introducía un 5% de celulosa micronizada (Reeves y col., 1993). El corrector mineral de las distintas dietas se preparaba de acuerdo con las recomendaciones del AIN (Reeves y col., 1993), teniendo en cuenta la composición que en ese sentido presentaban las dos leches desnatadas, incorporándose a la dieta a la concentración del 3,50%, AIN (Reeves y col., 1993). De igual manera, se incorporaba un corrector vitamínico en cantidad (1%) y composición, de acuerdo con lo indicado por el AIN (Reeves y col., 1993). Finalmente, calculada la cantidad de lactosa aportada por cada leche desnatada, el resto de componentes necesarios, se completaba por medio de almidón de trigo y sacarosa, en una proporción similar a la indicada por el AIN

(Reeves y col., 1993). En la Tabla 6 se presenta la composición en ingredientes de las cuatro dietas experimentales y en la Tabla 7, la composición química de las mismas.

3.1.2.- Metodica de los ensayos

Los animales se alimentaban *ad libitum*, disponiendo de agua durante todo el tiempo. La ingesta individual alcanzada y el peso vivo, se controlaban dos veces por semana. Durante la última semana del período experimental indicado, se llevaba a cabo un ensayo de balance, recogiendo individualmente durante el mismo, las heces y orina producida diariamente, guardándose hasta el momento de su análisis, a -20°C.

Tabla 7.- Composición química (% MS de las dietas experimentales)

	Dietas			
	1	2	3	4
MS	93,82	93,86	93,69	93,54
MO	96,49	96,54	96,99	96,96
Proteína	10,03	10,07	10,03	10,09
Grasa	10,00	10,00	10,00	10,00
Minerales	3,51	3,46	3,01	3,04
Energía (MJ/kg MS)	18,59	18,73	18,64	18,21

Dieta 1: Proteína y grasa de leche de cabra

Dieta 2: Proteína de leche de cabra; grasa de leche de vaca

Dieta 3: Proteína de leche de vaca; grasa de leche de cabra

Dieta 4: Proteína y grasa de leche de vaca

Terminado el ensayo de balance, se sacrificaban todos los animales después de ser anestesiados mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Pentotal; Abbot, Madrid). Una vez muertos, se procedía a limpiar el estómago e intestinos de su contenido, guardándose los cuerpos a -20°C. El manejo y mantenimiento de los animales experimentales, estuvo en todo momento, de acuerdo con las exigencias de la Unión Europea y normas y guías españolas, para el trato de animales de experimentación (Boletín Oficial del Estado, 1988).

Antes de proceder a su análisis y estando aún congelados, los cuerpos de los animales sacrificados al inicio y final de los ensayos, se picaban en picadora (Retsch, Haan, Alemania), empleando matriz de 1 mm, y con ayuda de N líquido con el fin de evitar calentamientos. La masa corporal de los animales, se guardaba a -20°C hasta el momento de su análisis.

3.1.3.- Medidas y análisis

Como se ha indicado, se determinaba la composición en fracciones proteínicas, el perfil aminoacídico de las dos fuentes de proteína y el de ácidos grasos de las dos fuentes de grasa, así como el contenido en proteína, grasa y minerales (Ca, P, Mg, Fe, Cu y Zn) de las dos leches desnatadas. De igual manera, se determinaba la composición química de las dos leches desnatadas, estimándose el porcentaje de lactosa como la diferencia entre 100 y la suma de los porcentajes de proteína, grasa y minerales.

Elaboradas las dietas, se determinaba su composición química, estableciéndose su contenido en materia seca, proteína, grasa, minerales y energía. Igualmente, en muestras apropiadas de heces, orina y masa corporal, se determinaba su contenido en materia seca, N y energía, así como el de grasa de las heces.

La materia seca de las leches desnatadas y de las dietas, se determinaba por desecación en estufa a $100\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24h y la de las heces, orina y masa corporal, por liofilización. La cantidad de minerales totales de las leches desnatadas, de las dietas y heces, se establecía por ignición en horno eléctrico a 550°C (AOAC, 2005). El contenido en N de las dos leches desnatadas de las distintas dietas, de las heces, orina y masa corporal, se determinaba por el método de Kjeldahl (AOAC, 2005). El contenido en N proteico de las dos leches desnatadas y de las distintas dietas, se calculaba como la diferencia entre el N total y el no proteico, siendo el N total determinado en muestras de la materia original y el no proteico, en el filtrado que se obtenía después de preparar una solución y precipitar las proteínas con ácido tricloroacético al 12% (peso/volumen). Las cantidades de N proteico se convertían en proteína, aplicando el factor multiplicador 6,38. De la misma manera, las cantidad de N de las muestras de heces, se convertían en proteína, aplicando el factor multiplicador, 6,25.

La cantidad de grasa de las dos leches desnatadas, se establecía por el método de Gerber (AOAC, 2005) previa preparación de una solución de las mismas. El contenido en grasa de las heces, se establecía por extracción con éter de petróleo (punto de ebullición 40-60°C, previa hidrólisis ácida con ClH 3 N (Sanderson, 1986). Con el fin de establecer el perfil en ácidos grasos de la nata (leche de cabra) y mantequilla (leche de vaca), los metil ésteres de los correspondientes ácidos grasos se separaban en un cromatógrafo de gases (Perkin-Elmer, Norfolk, CT), previsto de una columna capilar SP 2560 (100 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,20 µm; Supelco Bellefonte, P.A.) equipado con detector ionizador de llama (FID), siendo la programación de la temperatura la siguiente: de 100 a 185°C, de 185 a 230°C, 5°C/minuto, manteniéndose durante 26 minutos. El gas transportador era N₂ y las temperaturas de inyección y detección, de 300 a 325°C, respectivamente. La identificación de los picos correspondientes a los distintos ácidos grasos, se llevaba a cabo mediante la comparación de la muestra problema con una mezcla de ésteres de ácidos grasos de perfil cromatográfico conocido (mezcla FAME de 37 ácidos grasos; Supelco Bellefonte, P.A). Para identificar los isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA), se emplearon estándares del *cis-9 trans11* CLA y *trans 10-cis-12* CLA (Matreya Inc. P.A.). Con el fin de corregir las áreas de los picos individuales de los ácidos grasos de menos de 10 átomos de C, se empleaba un estándar de aceite de mantequilla (CRM 164; Commission of the European Community, Bureau of references, Bruselas).

El perfil en aminoácidos de la proteína de la leche desnatada de cabra y vaca, se determinaba por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase inversa, previa derivatización del hidrolizado de la muestra correspondiente, con fenil-isotiocianato, según el método Pico-Tag (Cohen y col., 1989) de bondad contrastada por Pérez Martínez (1995). Para cuantificar correctamente los aminoácidos metionina y cisteína, se llevaba a cabo un proceso de hidrólisis por oxidación perfórmica. Para la separación y la detección de los aminoácidos, se empleaba un cromatógrafo líquido de alto poder resolutivo, Waters modelo 2695 (Waters Cromatografía, S.A., Madrid), previsto de una columna Nova Pack C18 (3,0 x 150 mm, Waters). El detector (Waters 2487) se fijaba a 254 nanómetros. Para el control de

gradientes y procesado de datos, se utilizaba el programa Millennium 32 (Waters), manteniéndose el controlador de temperatura a 36°C. La identificación y cuantificación de los distintos aminoácidos se llevaba a cabo mediante el empleo de una disolución madre que contenía 17 aminoácidos (Pierce, BCl-180).

Las fracciones proteínicas de la proteína de las dos leches desnatadas, se establecía por la metodología NIRS (Burns y Ciurczak, 1992, 2001). Para ello se utilizaba un espectrofotómetro monocronador de espectro continuo (Foss-NIRS systems 6500 SY I), equipado con módulo de giro, el cual es capaz de realizar medidas entre 400 y 2500 nm. Cada espectro quedaba formado por 1050 valores de absorción de los que 350 correspondían a la zona del visible (400-1,100 nm) y 700 a la zona del infrarrojo cercano (1,100-2,500 nm). Para la recogida de espectros, se empleaba el programa ISI NIRS 3 versión 2,05 (Infrasoft, International, Port Matilda, PA, USA). El programa empleado para el tratamiento de los datos espectroscópicos, era el Winisi II, versión 1,04 FossNIRSystem/Tecator (Infrasoft International LLC). La preparación de las muestras para la lectura, consistía en un calentamiento de una solución de la leche a 40°C con posterior agitación, introduciéndose un filtro de vidrio (Millipore AP40) empapado en la muestra de leche.

La determinación del contenido en Ca y Mg de la leche desnatada de cabra y vaca, se determinaba por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer 1100 B; Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA), comparando con una serie de valores estándares. El contenido en P de las mismas clases de muestras, se establecía por espectrofotometría visible (Perkin-Elmer UV/VIS, spectrometer lambda 16) siguiendo la técnica de Fiske y Subbarow (1925).

3.1.4.- Parámetros obtenidos o estimados

Junto a las ingestas y pesos, se calculaban los coeficientes de eficacia en crecimiento (Δ peso/ingesta proteína) e índices de transformación (ingesta MS/ Δ peso), según dieta consumida, así como la digestibilidad de los nutrientes y de la energía, (cantidades aparentemente absorbidas respecto de las ingeridas), estableciéndose igualmente, el contenido de las dietas, tanto en energía digestible como metabolizable (kJ/g MS). De

acuerdo con las ingestas y excreciones correspondientes, se calculaban las cantidades tanto de N como de energía necesarias para establecer su utilización, así como la composición corporal final de los animales.

La energía retenida y la cantidad de proteína depositada a nivel corporal, se estimaban según el método de los sacrificios comparados, de acuerdo con la composición de los animales sacrificados al inicio y final del ensayo. La energía retenida como proteína se calculaba, multiplicando la cantidad de proteína depositada por el factor 23,8 (kJ/g de proteína) (Brouwer, 1965; Van Assendelft y col., 1973). La producción de calor total, se establecía como la diferencia entre la energía metabolizable ingerida y la energía total retenida. Como la energía retenida resulta ser esencialmente, la que lo hace en forma de proteína y grasa, la retenida como grasa, se calculaba como la diferencia entre la total retenida y la conseguida en forma de proteína. La producción de calor asociada a la utilización de proteína o grasa, se estimaba como la diferencia entre la correspondiente ingesta de energía metabolizable y la energía retenida, asumiendo que el depósito de grasa era enteramente de origen dietético (Astrup y col., 2002). Finalmente, la cantidad de grasa depositada, se calculaba dividiendo la cantidad de energía retenida como grasa, por 39,8 (kJ/g de grasa) (Brouwer, 1965; Van Assendelft y col., 1973). Los valores correspondientes a cada animal, se establecían considerando su peso medio, de acuerdo con el inicial y final del período experimental total.

3.1.5.- Tratamiento estadístico de resultados

Los valores obtenidos, fueron analizados estadísticamente, en un ordenador compatible PC, utilizándose el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows (Statgraphics, 2001).

Los valores correspondientes a cada animal según dieta consumida, se analizaron según un análisis de la varianza correspondiente a un diseño factorial: 2 (fuente de proteína) x 2 (fuente de grasa), de acuerdo con el modelo general lineal (Steel y Torrie, 1984). El modelo contemplaba el efecto causado tanto por la fuente de proteína como de grasa, así como la posible interacción entre ambos efectos. Cuando el término correspondiente a la interacción

resultaba no significativo ($P>0,05$) la partición de la varianza se establecía omitiendo dicho término. Las posibles diferencias existentes entre las medias correspondientes a los distintos tratamientos, se establecían utilizando el test de rango múltiple de Duncan. Las tablas de resultados recogen los valores medios, la desviación estándar residual y el nivel de significación correspondiente.

3.2.- Estudio comparativo de la capacidad inmunógena de la leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros

3.2.1.- Determinación del espectro antigénico de la leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros

Obtención de inmunisueros

Se obtuvieron en conejos, con la finalidad de disponer de anticuerpos policlonales específicos, para la identificación de las proteínas antigénicas de leche de cabra (LC), de vaca (LV), y de sus respectivos lactosueros: de leche de cabra (LLC) y de leche de vaca (LLV), mediante Western blot.

Animales

Para la obtención de anticuerpos policlonales se han utilizado 4 conejos macho de raza New Zealand de 2 a 2,5 kg de peso, suministrados por Harland Iberica, S.L. libres de patógenos (incluyendo ecto- y endoparásitos). Los animales se dispusieron en jaulas individuales, en una habitación a 25°C y períodos de iluminación de 12 horas, disponiendo de agua y comida *ad libitum*.

Leche de cabra y vaca entera. Obtención de lactosueros

Se utilizó un pool de leche de cabra de raza Granadina, de la Granja Experimental de la Excma. Diputación de Granada y otro de leche de vaca, de una explotación lechera de la zona, de raza Holsten Frisian.

Para obtener los lactosueros, los dos tipos de leche se desnataron, siguiendo lo indicado por Basch y colaboradores (1985). Tras centrifugación a 5.000 g a 4°C durante 30 minutos, y

filtración sobre cuatro capas de gasa, se separaba la grasa que quedaba en las paredes y en la superficie del líquido. La obtención de los lactosueros se realizó por precipitación de las caseínas por acidificación. Partiendo de LC, con una solución al 10% de ácido acético, se precipitaban las caseínas a pH= 4,1. Tras 20 minutos de reposo a temperatura ambiente, se centrifugaba a 4.500 g durante 20 minutos, a continuación se filtraba, recogiendo el sobrenadante (comunicación personal Dra. L. Amigo). En cuanto a LV se siguió en parte el procedimiento de Van Hekken y colaboradores (1992). La precipitación de las caseínas se realizaba a pH= 4,6 con una solución de ácido clorhídrico 1N. Una vez formado el precipitado, se centrifugaba a 6.000 g durante 15 minutos a 4°C, obteniéndose el lactosuero.

La composición en fracciones de la leche de cabra y vaca utilizada y de sus respectivos lactosueros, se muestra en la Tabla 8. Dicha composición se determinó por medio de la metodología NIRS tal como ya se ha descrito.

Tabla 8.- Composición en fracciones proteínicas de la leche de cabra y vaca y de sus respectivos lactosueros (%)

	LC	LV	LLC	LLV
Proteínas séricas	21,8	18,0	100,0	100,0
seroalbúmina	2,7	1,5	12,6	8,2
α -lactoalbúmina	6,5	12,0	29,7	66,6
β -lactoglobulina	12,6	4,5	57,7	25,2
Caseínas	78,2	82,0	-	-
α_{s1} -caseína	16,2	32,6	-	-
α_{s2} -caseína	11,0	8,5	-	-
β -caseína	45,4	30,2	-	-
κ -caseína	5,6	10,7	-	-

LC: Leche de cabra; LV: leche de vaca; LLC: lactosuero de leche de cabra; LLV: lactosuero de leche de vaca

En todas las soluciones se determinó la concentración en proteínas mediante el método del ácido bicínico (Smith y col., 1985), y alicuotándose y conservándose a -80°C hasta su uso. Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS), comprobamos su

patrón polipeptídico, lo que realizamos como se indica en la página 73. En cada carril se cargaban 6 µg de proteínas, empleando geles discontinuos de 0,75 mm de grosor. En el primer carril, depositábamos los patrones de pesos moleculares (se usaron los de alta precisión preteñidos de BIORAD). El segundo carril, se reservó para β-caseína de cabra, aislada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), obtenida por los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. En el tercero, se depositó IgG (H+L) de conejo (SEROTEC). Una vez terminada la electroforesis, el gel se separaba de los cristales, y se colocaba cuidadosamente en una solución de azul Coomassie R-2500, 1% en fijador (40% metanol, 10% de ácido acético) (BIORAD) durante 40 minutos, manteniéndose en agitación. Una vez transcurrido este tiempo, se recuperaba la solución de tinción y se añadía solución decolorante (25% de metanol, 7,5% ácido acético), cambiándola cada media hora hasta su decoloración. Los geles se analizaron con el programa Quantity One[®] 4.4.0 de BioRad.

Protocolo de inmunización

La inmunización por vía subcutánea, se realizó en diversos sitios de la espalda rasurada de los conejos. Se les inoculó un volumen de líquido que contenía 4 mg de proteína para el caso de LC y de LV, y de 3 mg, para los correspondientes lactosueros, emulsionado con un volumen igual de adyuvante completo de Freund para la primera inoculación (Sigma), y para las siguientes, con adyuvante incompleto (Sigma). Las inoculaciones se repitieron semanalmente durante un período de 50 días. El nivel de anticuerpos se evaluó en el suero, obtenido en sangrías semanales de la vena marginal de la oreja, mediante la técnica de inmunodifusión (González Castro y col., 1966) y la técnica ELISA (Gómez García y col., 2003). Al final del proceso los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (Pentotal; Abbot, Madrid), vía intraperitoneal, y se les realizó la sangría total mediante punción cardíaca. Antes de proceder a la inmunización de cada animal, se obtuvo una sangría 0 (S₀) con objeto de disponer de sueros normales controles, y además para determinar en la técnica ELISA el valor límite de densidad óptica (DO) a partir del cual, los sueros se consideraban positivos. Este valor límite se obtenía como la media de tres réplicas de la DO de la sangría 0

más tres veces la desviación estándar de las mismas. Todos los sueros se alicuotaron y se guardaron a -80°C hasta su uso.

Técnica de Inmunodifusión (ID)

Como ya hemos indicado, esta técnica se realizó para comprobar la riqueza en anticuerpos de los sueros obtenidos semanalmente durante el proceso de inmunización. La sangría total se realizó, cuando el número de bandas de precipitación no aumentaban y resultaban nítidas.

Como soporte usabamos una solución de agarosa (BioRad) al 1%, preparada en solución salina estéril. Los portas donde se realizaba la prueba, se sumerguían en una solución de agarosa al 0,1% en agua destilada, al objeto de que al depositar el soporte y una vez solidificado, no se desprendiera. En cada extremo del borde lateral del porta, se disponían unas láminas de plástico de 4 mm de grosor, depositándose la agarosa en la superficie señalada. Inmediatamente después, se colocaba una plantilla de plástico de superficie completamente lisa sobre la agarosa fundida. Se esperaba su solidificación y por desplazamiento lateral, se retiraba la plantilla.

Sobre la agarosa solidificada se perforaban unos orificios de tamaño variable, entre 3 y 5mm de diámetro: uno central, donde se disponía el antígeno, y los otros cuatro laterales, donde se colocaba el suero. Se depositan en cámara húmeda de 6 a 48 horas. El antígeno y el anticuerpo difunden y cuando se encuentran a la concentración adecuada, se forma una línea de precipitación.

Posteriormente, se lavaban los portas durante 24 horas en tampón fosfato (PBS) con azida de sodio (NaN_3 , Merck) a temperatura ambiente. A continuación se someten a otro lavado de 24h, con PBS, y finalmente se sumergía 4 horas en agua, para extraer las sales. La finalidad de los lavados era eliminar el exceso de inmunorreactivo que no hubiese reaccionado. A continuación los portas se secaban, envueltos en papel de filtro, a 37°C . Una vez secos, se procedía a su tinción. Los portas se sumerguían en solución de rojo Ponceau

(Sigma) de 1 a 5 minutos, y se decoloraban con ácido acético 10% (Merck) para eliminar el exceso de colorante.

Técnica ELISA

Se desarrolló siguiendo la técnica descrita por Gómez García y colaboradores (2003). Se sensibilizaron placas ELISA de poliestireno de alta afinidad de NUNC (como todas las empleadas en el presente trabajo), con LC, LV, LLC y LLV (5 µg/pocillo) diluyéndolas en tampón carbonato (Merck), 0,1M, pH=9, y 0,02% de NaN₃. Tras una hora de incubación de la placa, se añadían dobles diluciones de los sueros de conejo, en PBS comenzando al 1/8. El siguiente paso fue la incubación con una anti-IgG (H+L) de conejo conjugada con peroxidasa (BioRad), diluida al 1/3000 en PBS-0,05% Tween 20 (Merck). Finalmente la reacción se revelaba usando 0,003% de H₂O₂ (Sigma), como sustrato y 1 mg/ml de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS, Sigma) como cromógeno, disueltos en tampón citrato-fosfato (Merck), pH=4,0. Tras 15 minutos en oscuridad, se realizaba la lectura de la DO de los pocillos a 405 nm, en un lector de placas BioRad modelo 550, programa Microplate Manager[®] versión 4.0. En todos los casos se empleó un volumen de 100 µl e incubaciones de 30 minutos a 37°C. Los lavados entre los pasos se hicieron con 0,05% de Tween-20 en agua corriente, 3 veces durante 5 minutos cada vez. El valor límite para cada animal se determinó con tres réplicas de su sangría 0 más tres veces la desviación estándar a la dilución 1/8.

Técnica de Western blot

La identificación de las proteínas antigénicas en LC, LV, LLC y LLV se realizó mediante la técnica de Western blot, técnica que consta de tres pasos: separación de los polipéptidos de las diferentes soluciones mediante electroforesis, electrotransferencia a nitrocelulosa y, reacción inmunológica con los sueros inmunes de los conejos.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida (BioRad), en condiciones reductoras y en presencia de SDS (dodecil sulfato sódico, BioRad), según el

sistema descrito por Laemmli, (1970). Hemos empleado un equipo Mini-Protean II de BioRad. Usábamos un peine de 10 carriles y en cada carril se han cargado 40 µg de proteínas, reservando el carril inicial de la izquierda, para los patrones de pesos moleculares (usábamos los de alta precisión y preteñidos de BIORAD). El segundo carril, se reservaba para β-caseína de cabra aislada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), obtenida por los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

Se empleaban geles discontinuos de 7,3 cm (longitud) x 8,0 cm (anchura) x 1,5 mm (grosor), formados por un primer gel con un 4% de acrilamida/bis (BioRad), 125 mM de Tris-ClH (pH=6,8) (Sigma) y 0,1% de SDS, y un segundo gel con un 17% de acrilamida-bis, 375 mM de Tris-HCl (pH=8,8) y 0,1% de SDS. Durante la electroforesis, el primer gel tiene la misión de condensar las proteínas en una banda estrecha, de forma que entren juntas en el segundo gel, donde tiene lugar la separación en función de sus pesos moleculares.

El tampón de electroforesis se componía de 25 mM de Tris (Sigma), 192 mM de glicina (BioRad) y 0,1% de SDS, con un pH de 8,3. Las muestras se preparaban calentando a 100°C durante 3 minutos, una mezcla de volúmenes iguales de la solución proteica y un tampón que contenía 4,6% de SDS, 10% β-mercaptoetanol (BioRad), 20% p/v de glicerina (Sigma), 125 mM de Tris, 0,01% de azul de bromofenol (BioRad) y ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH de 6,8. La electroforesis se llevó a cabo a 4°C y 200 voltios durante 1 hora.

Electrotransferencia

Una vez separadas las proteínas en el gel de poliacrilamida, se transferían a un soporte para llevar a cabo la reacción inmuno-enzimática, técnica descrita por Towbin y colaboradores (1979). Como soporte se empleaba nitrocelulosa de 0,45 µm reforzada con acetato de celulosa (de laboratorios Whatman, suministrada por BioRad). La transferencia se realizaba durante 12 horas, a 4°C, a 30 voltios, en un tampón con 20% de metanol (Sigma), 25mM de Tris y 192 mM de glicina. El gel se equilibraba previamente durante 15 minutos con el tampón, para eliminar los restos de SDS que podrían interferir en la unión de las proteínas a la nitrocelulosa.

Técnica inmuno-enzimática

Tras la transferencia, se cortaba el carril de la hoja correspondiente a los estándares de pesos moleculares. El resto, se sumergía durante 10 minutos en PBS-Tween 20 al 0,3% (al que nos referiremos de aquí en adelante como PBS-T). A continuación se cortaban e incubaban los carriles con los respectivos sueros inmunes de los conejos, diluidos al 1/100 en PBS-T durante 1 hora (ésta y las siguientes incubaciones se realizaron a temperatura ambiente). Tras 3 lavados de 10 minutos con PBS-T, se incubó la hoja durante 1 hora con una anti-IgG (H+L) de conejo marcada con peroxidasa diluida a 1/3000 en PBS-T. Después de 3 lavados con PBS-T y uno adicional de 5 minutos con PBS, la reacción se revelaba en la oscuridad durante 10 minutos con un 0,01% de H₂O₂ (como sustrato) y 0,05% de 4-cloro-1-naftol (como cromógeno), disueltos en PBS/metanol 5/1. Los espectros polipeptídicos reconocidos, fueron analizados con el programa Quantity One[®] 4.4.0 de BioRad.

3.2.2.- Análisis de la capacidad alergénica de la leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros: Ensayos *in vivo*

Se llevaron a cabo 4 ensayos de alergenicidad *in vivo*. En el Ensayo 1, hemos utilizado LC y LV como agentes inmunizantes y tras la sensibilización oral de los cobayas, se procedía a realizar la prueba de anafilaxia sistémica. El Ensayo 2, consistió en la realización de la prueba de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) con LC y LV. Para la sensibilización pasiva, se empleaba un pool de sueros, procedentes de los animales que presentaron choque anafiláctico en el primer ensayo. En el Ensayo 3, se inmunizó con LLC y LLV y realizamos la prueba de anafilaxia sistémica. Y por último, en el Ensayo 4, realizamos la PCA con los mismos antígenos que en el Ensayo 3. Para la sensibilización pasiva, se empleaba un pool de sueros, procedentes de los animales que presentaron choque anafiláctico en el tercer ensayo.

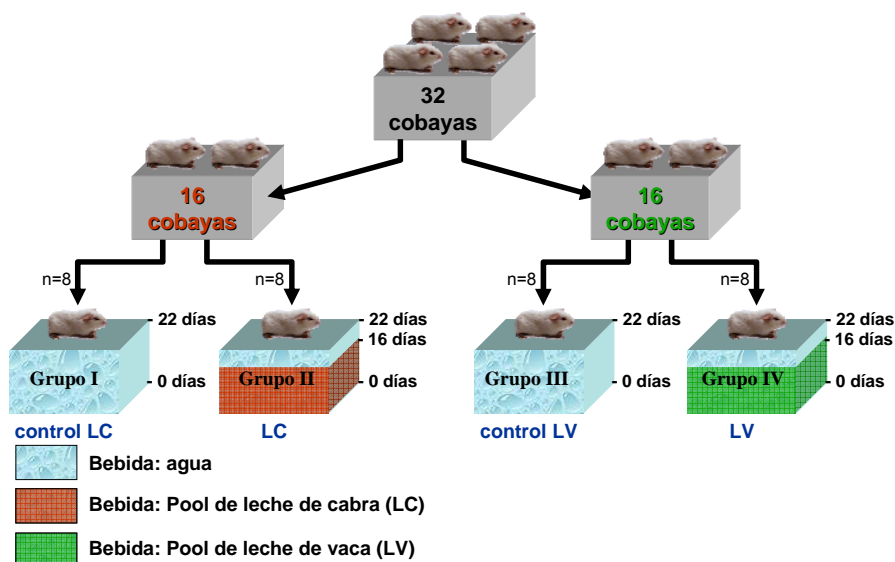
Animales

En cada ensayo tomaban parte 32 cobayas macho de la raza *Dunkin Hartley*, de 200,0 - 241,8 g de peso, suministrados por Harlan Ibérica, S.L. libres de patógenos (incluyendo ecto- y endoparásitos). Los animales se mantenían en jaulas, con control de temperatura, 23°C, y

50-60% de H.R. y con período de iluminación de 12h diarias. Los animales se alimentaban *ad libitum*, con una dieta sólida libre de proteínas lácteas. El agua y las soluciones inmunizantes también fueron ingeridas *ad libitum*. Los animales se mantenían una semana en período de adaptación, comenzándose a continuación los ensayos.

Prueba de anafilaxia sistémica para leche de cabra y vaca: Ensayo 1

Los 32 cobayas macho de las características indicadas, se distribuyeron en cuatro grupos de acuerdo al diseño experimental que describimos a continuación. El ensayo tuvo una duración de 22 días. Los animales de los grupos II y IV bebían durante 15 días LC y LV respectivamente, y del día 16 al 22, todos los animales pasaban a beber sólo agua. Los animales de los grupos I y III, fueron los controles del ensayo y bebieron sólo agua.

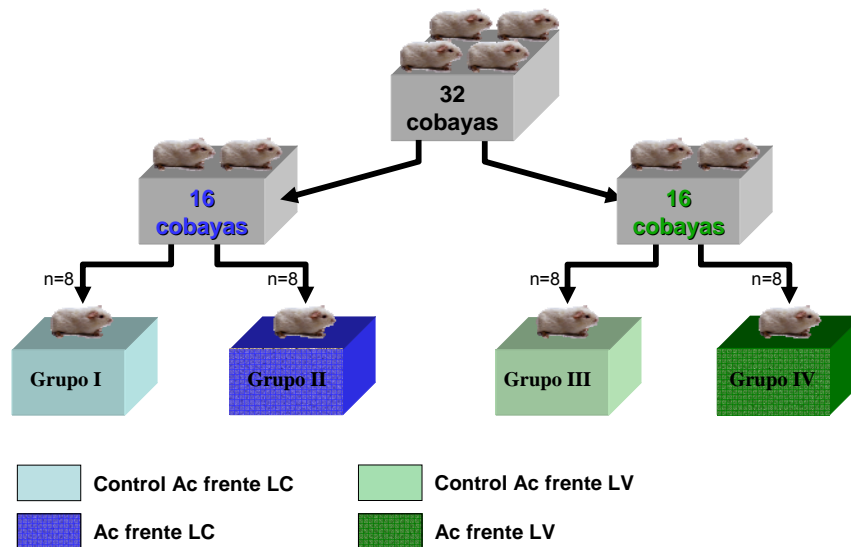


A todos los cobayas se les extrajo sangre del plexo venoso orbital los días 0 y 22. La prueba de anafilaxia sistémica se realizaba el día 22, inyectando a cada animal, por vía venosa (vena safena anterior), una concentración proteica de 25,36 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la correspondiente leche (LC para los animales del grupo I y II y, LV para los del grupo III y IV) en 0,5 ml de solución salina estéril. Observándose los animales, se comprobaba en cuáles se producía anafilaxia fatal o no (Boza y col., 1994; Darmon y col., 1998). Los sueros de los animales correspondientes a la sangría de los días 0 y 22, se alicuotaron y se conservaron a -80°C hasta su uso en la prueba de PCA y su estudio serológico. Los animales que no

sufrieron choque anafiláctico, se sacrificaban bajo anestesia con pentobarbital sódico (Pentotal; Abbot, Madrid).

Prueba de anafilaxia cutánea pasiva para leche de cabra y vaca: Ensayo 2

Las soluciones antigénicas fueron las mismas que las del Ensayo 1, siguiendo el diseño experimental indicado a continuación:



Los cobayas se distribuyeron en cuatro grupos de 8 animales cada uno. A los del grupo II y IV se les inoculaba en la espalda, vía intradérmica, con los correspondientes sueros de los cobayas inmunizados por vía oral (Ensayo 1) y que presentaron anafilaxia fatal. A las 24h, se les inyectaba por vía venosa (vena safena anterior), el correspondiente antígeno. Los animales de los grupos I y III sirvieron de controles.

Para la sensibilización pasiva, se realizaba una mezcla con los sueros de los animales de los grupos II y IV del Ensayo 1, que habían sido positivos a la prueba de anafilaxia sistémica y diluyéndose al 1/2 con solución salina estéril. De esta nueva solución se inyectaba 0,1 ml por vía intradérmica, en la espalda rasurada de los animales. Pasadas 24 h, y por vía venosa, se administraba 0,5 ml de las mismas soluciones usadas para la anafilaxia sistémica (LC y LV), junto con un 2% de azul Evans (Merck). Treinta minutos más tarde, se sacrificaban los animales bajo anestesia con pentobarbital sódico (Pentotal; Abbot, Madrid), midiéndose los

diámetros de extravasación del colorante. Una reacción coloreada mayor de 0,5 cm de diámetro, se consideraba positiva (Pahud y col., 1988).

Prueba de anafilaxia sistémica para lactosuero de cabra y vaca: Ensayo 3

Para la inmunización oral se empleaban los lactosueros de cabra y vaca (LLC y LLV, respectivamente). Se seguía el mismo diseño experimental y protocolo de inmunización, que en el Ensayo 1. La concentración proteica de los lactosueros era de 7,91 µg/µl.

Prueba de anafilaxia cutánea pasiva para lactosuero de cabra y vaca: Ensayo 4

El protocolo seguido fue el indicado para el Ensayo 2, a excepción de las sustancias líquidas inmunizantes, que en este caso han sido LLC y LLV. La concentración de proteínas resultaba igual a la del Ensayo 3.

Estudio serológico en los Ensayos 1 y 3: Determinación de IgG (Fc) e IgG1

Se realizaba con los sueros de los animales procedentes de los ensayos de anafilaxia sistémica, inmunizados por vía oral.

Técnica ELISA

Con la técnica ELISA, determinamos los anticuerpos IgG1 y IgG (Fc) específicos frente a los distintos antígenos utilizados en los Ensayos 1 (LC y LV), y 3 (LLC y LLV), en la inmunización oral de los cobayas. Los sueros procedían de los animales de los grupos II y IV de dichos ensayos. Para la realización de la técnica se siguió el protocolo ya indicado en la página 73, con las siguientes salvedades:

- La dilución de partida de los sueros fue 1/4, continuando con dobles diluciones hasta obtener su título. El punto de corte se determinaba a partir de la media de tres réplicas del valor de DO de la sangría cero de cada animal, más tres veces la desviación estándar.
- En el análisis estadístico de los resultados, usabamos los valores de DO de los sueros a la dilución 1/64 para todas las soluciones inmunizantes.

- Los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa, fueron suministrados por SEROTEC. La IgG (Fc) anti-cobaya marcada con peroxidasa, se utilizó al 1/10000 y la IgG1 al 1/5000. El punto de corte se determinó como anteriormente se ha indicado.

Técnica de Western blot

Se ha llevado a cabo siguiendo lo descrito en la página 73. Los sueros pertenecían a los mismos animales, en los que se determinaban los anticuerpos sistémicos por ELISA, frente al antígeno específico que los inmunizó. Los sueros se ensayaron diluidos al 1/4. Los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa anti-cobaya IgG (Fc), se usaron diluidos al 1/500 y los anti-cobaya IgG1 al 1/1000.

3.2.3.- Determinación de la reactividad cruzada entre los componentes de leche de cabra, leche de vaca, lactosuero de cabra y lactosuero de vaca: Ensayos *in vitro*

Hemos empleado los siguientes sueros:

- a) Los 4 inmunisueros obtenidos en conejos frente a LC, LV, LLC y LLV.
- b) Sueros de cobayas inmunizados por vía oral frente a proteínas de los dos tipos de leche y frente a la de sus correspondientes lactosueros.
- c) Sueros de cobayas inmunizados con LC y LV por inoculación parenteral.

Ensayos realizados en los sueros inmunes de conejos

Técnica ELISA

Se determinaba mediante ELISA su reactividad, empleando como antígeno, las soluciones inmunizantes distintas frente a las que se había obtenido el correspondiente inmunisero, es decir, realizando una reacción heteróloga. Así mismo, por Western blot y utilizando también antígenos heterólogos, se determinaba el número de moléculas con epítopos comunes responsables de la reactividad cruzada.

La técnica ELISA se realizaba siguiendo la pauta indicada en la página 73. Los sueros se ensayaron diluidos al 1/4096 y el valor de DO correspondió al valor medio de tres réplicas.

Técnica de Western blot

El Western blot se llevó a cabo siguiendo lo descrito en la página 73, con los sueros diluidos al 1/50.

Ensayos realizados en los sueros de cobayas inmunizados por vía oral

Técnica ELISA

En los sueros de los animales inmunizados por vía oral frente a LC, LV, LLC, y LLV se determinaba mediante ELISA, su reactividad cruzada, empleando como anteriormente hemos indicado, antígenos heterólogos. La dilución de los sueros fue de 1/4 siguiendo con dobles diluciones.

Técnica de Western blot

Para el Western blot los sueros fueron ensayados al 1/10.

Ensayos realizados en los sueros de cobayas inmunizados por vía intraperitoneal con LC y LV

Con esto tratábamos de conocer, si cuando la LC y LV se administran sin someterse al proceso de digestión, los anticuerpos producidos reconocen los mismos polipéptidos.

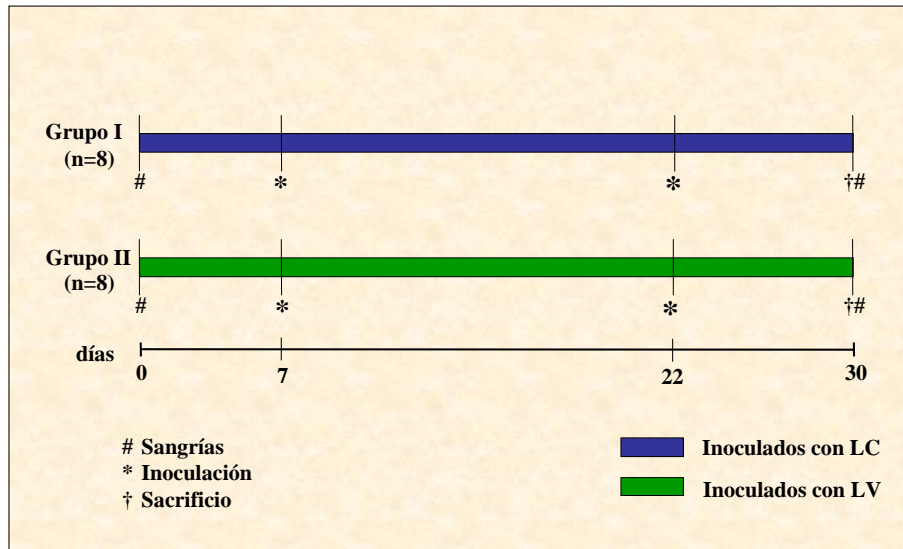
Diseño experimental

Se disponía de 16 cobayas suministrados por la casa comercial ya citada, sin modificar las características de anteriores ensayos y mantenidos en cámara ecológica, bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad y fotoperíodo. Los animales consumían una dieta estándar y bebían agua *ad libitum*. El diseño experimental seguido, se indica a continuación:

Los animales se distribuyeron en 2 grupos de 8 cobayas cada uno:

Grupo I: inmunización intraperitoneal con LC

Grupo II: inmunización intraperitoneal con LV



Los animales recibían vía intraperitoneal, una primera inoculación de 1ml de LC y LV, con un contenido en proteínas era de 25,36 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A los 15 días, se practicaba una segunda inoculación, con un volumen de 300 μl . A los ocho días de la segunda inoculación, los animales se sacrificaban por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (Pentotal; Abbot, Madrid). El día 0 se extraía sangre del seno orbital y al sacrificio, por punción cardiaca.

Técnica ELISA

En los sueros de los animales determinábamos anticuerpos, empleando antígenos homólogos y heterólogos. Para ello seguíamos el protocolo indicado en la página 73 para la técnica ELISA. La dilución inicial de los sueros fue 1/4 continuando con dobles diluciones hasta su titulación.

Técnica de Western blot

Se siguió lo indicado en la página 73. Los sueros se usaron al 1/10.

3.2.4.- Tratamiento estadístico de resultados

Los resultados correspondientes a las pruebas de anafilaxia sistémica (Ensayos 1 y 3) y anafilaxia cutánea pasiva (PCA) (Ensayos 2 y 4), se analizaron estadísticamente aplicando un test de igualdad de porcentajes (Sokal y Rohlf, 1979).

Las ingestas alcanzadas por los cobayas tanto de LC como de LV (Ensayo 1) y LLC y LLV (Ensayo 3), se compararon según tipo de leche por medio de un análisis de la varianza simple (Steel y Torrie, 1984).

Los valores de DO determinados por ELISA, para IgG(Fc) e IgG1, a la dilución en cada caso considerada, correspondientes a los Ensayos 1 y 3, se sometieron a un análisis de la varianza (Steel y Torrie, 1984). De esta manera se establecían las diferencias:

- Entre grupos (grupo III/IV) para un mismo isotipo
- Entre isotipos (IgG(Fc)/IgG1) para un mismo grupo
- Entre tipo de reacción (homóloga/heteróloga) para un mismo grupo e isotipo

En estos casos, cuando la ingesta bien de leche de cabra y vaca o lactosuero de leche de cabra y de leche de vaca, no resultaba diferente entre grupos ($P > 0,05$), los valores individuales fueron considerados como factor de covarianza. Cuando el efecto del factor no resultaba significativo ($P > 0,05$), las medias cuadráticas se calculaban omitiendo dicho término del modelo (Steel y Torrie, 1984).

Los distintos tratamientos indicados se llevaron a cabo en un ordenador compatible PC, utilizándose el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows (Statgraphics, 2001).

4. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Valor nutritivo de la leche de cabra y vaca. Utilización de su proteína y energía

4.1.1.- Composición aminoacídica y en distintas fracciones de la proteína de la leche desnatada de cabra y vaca

La composición aminoacídica de la proteína de la leche de cabra y vaca se muestra en la Tabla 2, recogiendo en la Tabla 3, la correspondiente a alguna de sus fracciones. Respecto de los aminoácidos esenciales, los porcentajes de treonina, leucina, lisina, cistina, fenilalanina y valina, resultaban más altos en la proteína de leche de cabra, sucediendo lo contrario, respecto de los valores de triptófano, isoleucina, metionina y tirosina. La totalidad de estos aminoácidos en los dos tipos de leche, resulta muy similar (46,2 y 46,6% para la leche de cabra y vaca, respectivamente).

En cuanto a la información hoy disponible sobre este aspecto de la composición de los dos tipos de leche que consideramos, los valores resultan diferentes según la fuente y sobre todo, el modo de expresión de los mismos. Park (2006) revisando este aspecto de la composición de la leche de cabra, recoge la información dada por Davis y colaboradores (1994) sobre la composición de la leche de distintas especies de primates en relación con la de no-primates, indicando estos autores cómo parece que existen ciertas similitudes en relación con el modelo de composición aminoacídica de las correspondientes proteínas. De acuerdo con esto y coincidiendo con los valores obtenidos en nuestro estudio, se señala que los aminoácidos más abundantes son el glutámico (20%), la prolina (10%) y leucina (10%), resultando la suma de esenciales sobre un 40% y de los azufrados, un 4%. Junto a esto, al comparar la composición dada por Davis y colaboradores (1994) para la leche de cabra y vaca, observamos en relación a los nuestros ciertas diferencias. Según los datos recogidos por los autores indicados, la proteína de la leche de cabra presentaría frente a la de vaca, cantidades mayores de ácido aspártico, histidina, treonina, alanina, prolina y valina. En nuestro caso, y coincidiendo con lo anterior, las cantidades de treonina, prolina y valina,

resultaban más altas en la proteína de la leche de cabra, sucediendo lo contrario para la cantidad de aspártico, y no mostrando claras diferencias, los niveles de histidina y alanina. De la información recogida por Davis y colaboradores (1994), igualmente se deduce que los niveles de serina, arginina, tirosina, metionina, leucina, fenilalanina y lisina, serían más bajos en la proteína de la leche de cabra frente a la de vaca. Comparando con los datos obtenidos por nosotros, lo últimamente indicado coincide en relación con los niveles de serina, arginina, tirosina y metionina, resultando por el contrario, en nuestro caso, mayores las cantidades detectadas en la proteína de la leche de cabra, en relación con los aminoácidos, leucina, fenilalanina y lisina. Igual tipo de comparación podemos realizar respecto de los aminoácidos que Davis y colaboradores (1994) recogen como similares en ambos tipos de leche: ácido glutámico, glicina y cistina. En nuestro caso, los niveles de glutámico y cistina resultaban más altos en la proteína de la leche de cabra, sucediendo lo contrario respecto de la glicina.

Junto a la información comentada, en la que la composición aminoacídica que se indica se refiere a la de la proteína de cada tipo de leche, a veces, se presenta otra en la que ésta se refiere a un mismo volumen de leche (Posati y Orr, 1976). En estos casos la composición correspondiente, debe considerarse sin olvidar, que generalmente, el extracto seco de una leche de cabra resulta sensiblemente más alto que el de vaca, lo que hace que el contenido en proteína sea de la misma manera, también mayor, por lo que las concentraciones de los distintos aminoácidos, pueden resultar muy diferentes de las que corresponderían a la proteína en cuestión. Comparando la composición de la leche de cabra de raza Granadina con la de vaca Holstein-Friesian, a lo largo de todo un año, Sanz Sampelayo (comunicación personal), obtiene valores medios de extracto seco y proteína de: 135,7 y 34,8 g/kg de leche en la cabra y, 113,7 y 28,2 g/kg en la de vaca, respectivamente. En el trabajo indicado de Posati y Orr (1976), los autores recogen el contenido de los distintos aminoácidos, de 100 g de leche, deduciendo de este modo, cómo la de cabra presentaba frente a la de vaca, mayores cantidades de 6 de los 10 aminoácidos esenciales; concretamente, treonina, isoleucina, lisina, cistina, tirosina y valina.

Park (2006) comenta cómo la composición aminoacídica de la proteína de la leche de cabra, puede resultar, en razón de su composición en los distintos tipos de caseína según genotipo, más diferente dentro de esta especie, que entre por ejemplo, ella y la de vaca. Según este autor, las α -caseínas presentan niveles más altos de ácido aspártico, lisina y tirosina que las β -caseínas y, éstas a la vez, mayores cantidades de leucina, prolina y valina. Teniendo en cuenta esta información y junto a la composición en aminoácidos de las dos clases de proteína en cuestión, la de las fracciones proteicas de las mismas, información recogida en la Tabla 3, podemos observar que en general, lo indicado por Park (2006), coincide con lo aquí obtenido, a excepción del contenido en lisina que en nuestro caso, resulta más alto en la proteína de la leche de cabra a pesar de su menor contenido, sobre todo, en α_{S1} -caseína. Lo indicado en razón de la proporción en β -caseína, decimos que igualmente coincide con el perfil aminoacídico aquí detectado, pues si bien esa fracción no fue determinada en nuestras muestras, en general se sabe cómo resulta ser la caseína presente en mayor cantidad, en la proteína de la leche de cabra (Boza y Sanz Sampelayo, 1997).

La Tabla 3, muestra la composición en fracciones de la proteína de la leche de cabra y de vaca. En dicha Tabla se presenta la partición en caseína y proteínas séricas, así como también las cantidades α_{S1} y α_{S2} -caseínas. La distinta composición en cuanto a estas dos últimas fracciones, indica uno de los aspectos más característicos de composición de la caseína de ambos tipos de leche. La cantidad de α_{S1} -caseína presente normalmente en la leche de cabra, resulta mucho menor que la de vaca normalmente alcanza, aspecto referido desde hace tiempo (Pierre y Portmann, 1970; Jenness, 1980), conociéndose desde la década de los 80 que en función de su particular polimorfismo genético, los niveles de esta proteína pueden variar considerablemente de acuerdo con el particular genotipo animal (Boulanger y col., 1984). La importancia de este aspecto de la composición de la proteína de la leche de cabra, reside en que aquélla más rica en α_{S1} -caseína, presenta unas mejores características tecnológicas en cuanto a su transformación en queso (Grosclaude y col., 1994), pudiendo alcanzar por el contrario, las más pobres en α_{S1} -caseína, una mejor calidad nutritiva, en razón sobre todo, del distinto aprovechamiento que a nivel digestivo, puede establecerse (Haenlein, 2004).

Otro aspecto que normalmente se indica y del que puede derivarse igualmente, un distinto aprovechamiento nutritivo, es el que se refiere a la mayor proporción que la proteína de la leche de cabra puede presentar de proteínas séricas, las que en razón de su mayor solubilidad pueden resultar, sobre todo, más digeribles (Boza y Sanz Sampelayo, 1997). En cuanto a este aspecto, la proteína de las dos leches desnatadas utilizadas para la elaboración de las distintas dietas experimentales, mostraban un distinto contenido en proteínas séricas presentando la leche de cabra, un valor algo más alto.

4.1.2.- Perfil en ácidos grasos de las grasas

En cuanto al perfil en ácidos grasos de la grasa tanto de la nata de leche de cabra, como de la mantequilla de leche de vaca, información recogida en la Tabla 5, el primer aspecto a destacar es el que se refiere a su contenido en los llamados triglicéridos de cadena media, o más exactamente, ácidos grasos de cadena media (C4 – C14), los que alcanzan como era de esperar, un porcentaje sensiblemente mayor en la grasa procedente de leche de cabra. Como se ha indicado en la revisión bibliográfica de este estudio, los aspectos más interesantes ligados tanto al valor nutritivo como saludable de la leche de cabra, se deben sin duda, al aspecto de composición de su grasa que comentamos (Velázquez, y col., 1996; Boza y Sanz Sampelayo, 1997; Alférez y col., 2001; Haenlein, 2001, 2004; López Aliaga y col., 2003), lo que vuelve de nuevo a ponerse de manifiesto, en relación con los resultados experimentales aquí obtenidos, según dieta consumida, que se discuten en los apartados referentes a la utilización digestiva y metabólica de las dietas, tanto del nitrógeno como de la energía de las mismas, así como en lo referente a la composición corporal de los animales experimentales.

El segundo aspecto de la composición de estas dos grasas lácteas digno de comentar, es el que se refiere a su contenido en las distintas formas de ácido linoleico conjugado (CLA), a las que se le atribuyen distintas propiedades sumamente beneficiosas para la salud del consumidor, como son las de resultar anticancerígenas y antilipogénicas (McGuire y McGuire, 2000). La grasa de la leche de cabra, mostraba en nuestro caso, una ausencia total de C18:1 *trans*, junto a cantidades más altas de CLA total. El primero de estos resultados,

coincidente con lo indicado por Alonso y colaboradores (1999), puede considerarse como positivo ya que en general, a los ácidos grasos *trans* se les atribuye los principales efectos perjudiciales que se les reconocen a los saturados (Chilliard y col., 2003). En cuanto al mayor contenido en CLA detectado en la grasa de la leche de cabra, no existe información anterior que indique esta diferencia. En general, lo que al respecto se opina, es que dicho contenido más bien dependerá, dado el origen de estos ácidos grasos, de la alimentación que el animal haya recibido (Bauman y Griinari, 2001). El que el pequeño rumiante produzca, muchas veces, una leche con niveles más altos de CLA que la que muestra la de vaca, podría simplemente deberse al modo semiextensivo en que estos animales normalmente se explotan en determinadas áreas, como toda la cuenca mediterránea, donde por el contrario, la vaca se mantiene más bien bajo condiciones intensivas. Sin embargo y volviendo a los resultados aquí obtenidos, el perfil en formas de CLA detectado en la grasa de la leche de cabra, resulta bastante diferente del correspondiente al de vaca, aspecto que pone de manifiesto lo indicado por Chilliard y colaboradores (2003), de que la regulación del funcionamiento de las células mamarias difiere entre la especie caprina y bovina. Finalmente, respecto de los valores concretos detectados, resultan para la grasa de leche de cabra, comprendidos entre el 0,4 – 0,9%, considerados normales en el caso de animales no suplementados con grasa (Alonso y col., 1999; Gulati y col., 2000).

En cuanto a la composición global de ambas grasas, en relación con sus porcentajes totales de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, lo más digno de destacar es que si bien los contenidos en saturados y monoinsaturados, resultan prácticamente idénticos, el de poliinsaturados alcanza un valor más alto en la grasa láctea de cabra. Dentro de los poliinsaturados y al distinguir entre los pertenecientes bien a la serie n-6 como n-3, se observa que la grasa de la leche de cabra presenta cantidades mayores de ambos tipos de ácidos grasos, resultando en este caso, sensiblemente menor la razón n-6/n-3, aspecto que le confiere una mejor calidad (Valenzuela y col., 1999).

En relación al contenido y composición en ácidos grasos saturados, debe indicarse que no todos pueden considerarse iguales en cuanto a su efecto sobre los niveles de colesterol

sanguíneo. En principio, sólo el ácido láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) parecen participar de este efecto (Grundy y Denke, 1990), existiendo evidencias que apuntan a tener que considerar más bien al ácido palmítico, con mínimos efectos en cuanto al aspecto indicado (Hayes y col., 1991). Por lo tanto, los ácidos grasos saturados que parecen ser más perjudiciales, serían sólo el ácido láurico y mirístico, los que por otra parte, resultan ser de cadena media y en consecuencia, participando de su peculiar metabolismo, pueden ejercer sólo sus efectos negativos en los casos de ingestas altas de grasa.

4.1.3.- Composición mineral de la leche desnatada de cabra y vaca

La composición correspondiente a este aspecto de las dos leches desnatadas utilizadas, se presenta en la Tabla 3, observándose que tanto las cantidades de Ca, P, Mg, Fe y Cu, resultaban más elevadas en la leche desnatada de cabra, detectándose en ella por el contrario, un nivel menor de Zn.

Como indican Boza y Sanz Sampelayo (1997), uno de los principales aspectos por los que la leche se considera un alimento excepcional, es por los minerales que aporta, particularmente Ca altamente biodisponible, así como P, en la relación más idónea para su absorción (Ca/P entre 1,0 – 1,5). En opinión de Moreno (1995), resulta difícil para el ser humano, obtener un aporte adecuado de Ca en cantidad y en relación con el P, sino es a partir de un consumo apreciable de leche o productos lácteos. En cuanto al contenido que en estos minerales la leche de cabra alcanza respecto de la de vaca, en general se indica que la primera, muestra valores mayores de ambos elementos (Jenness, 1980; Boza y Sanz Sampelayo, 1997; Haenlein, 2004), aspecto coincidente con los resultados obtenidos por nosotros. Park (2006), comenta cómo en relación con la leche de cabra, la humana presenta sólo de 1/4 a 1/6 de estos dos minerales, indicando igualmente, que aunque los niveles de los macrominerales pueden fluctuar considerablemente, sus cantidades pueden variar dependiendo de la raza, dieta, estado de lactancia, etc. Este mismo autor (Park, 2006) al comparar en su revisión, la composición mineral de la leche de cabra frente a la de vaca,

indica que tanto el contenido en 100 g de leche de Ca, P y Mg resultan más altas en la leche de cabra. Por el contrario, recoge valores algo menores de Fe y Cu y similares de Zn.

4.1.4.- Composición vitamínica de la leche desnatada de cabra y vaca y grasas de leche de cabra y vaca

En la Tabla 4, se presentan los resultados obtenidos referentes a los contenidos en determinadas vitaminas, tanto de las dos leches desnatadas como de la grasa de la nata de leche de cabra y mantequilla de leche de vaca. Respecto de las vitaminas liposolubles, las cantidades tanto de vitamina A como D, se detectaron más altas en la grasa de leche de cabra, sobre todo la segunda de ellas. De las hidrosolubles, determinadas en los dos tipos de leche desnatada, la de cabra mostraba niveles más altos, tanto de vitamina B1 como de ácido nicotínico, alcanzando por el contrario, concentraciones más bajas de vitamina B12 y ácido fólico.

Park (2006) en su reciente revisión sobre la composición y valor nutritivo de la leche de cabra indica, cómo en general muestra niveles más altos de vitamina A que la de vaca, comentando igualmente, el aporte adecuado que presenta en ácido nicotínico junto a un exceso en vitamina B1, B2 y ácido pantoténico, para, sobre todo, la edad infantil. Este autor igualmente informa de cómo los niveles de vitamina B12 y, sobre todo, de ácido fólico, resultan sensiblemente más bajos que los existentes en la leche de vaca, resultados que coinciden con los valores por nosotros aquí detectados. Sin duda, la deficiencia que la leche de cabra muestra en cuanto a su composición vitamínica, sobre todo en lo referente a su contenido en ácido fólico, ha constituido unos de los handicap que desde hace tiempo han influido más negativamente en la extensión de su empleo en el ser humano (Collins, 1962; Park, 2006).

4.1.5.- Ingesta de alimento, coeficientes de eficacia en crecimiento e índices de transformación del alimento, según dieta consumida

Las ingestas medias diarias (g MS/animal y día) resultaban no diferentes según tipo de proteína y grasa de las dietas ($P>0,05$). Por el contrario, los valores de los coeficientes de eficacia en crecimiento (CEC; Δ peso/ingesta proteica) e índices de transformación (IT; ingesta MS/ Δ peso) aparecían, en un principio, afectados por el origen de la grasa ($P<0,05$) (Tabla 9), detectándose en consecuencia, para el primer caso, CEC, un valor medio más alto, con el empleo de la grasa de la leche de cabra y, en el segundo IT, un valor medio más bajo. Al mismo tiempo, y de acuerdo con la interacción entre factores detectada significativa ($P<0,05$), se deducía cómo el efecto comentado del tipo de grasa, se debía exclusivamente, a lo que sucedía bajo consumo de las dietas con proteína de leche de vaca. En resumen y para los dos parámetros indicados, el valor correspondiente a la dieta cuya proteína y grasa procedía de leche de vaca, resultaba estadísticamente ($P<0,05$) más bajo que los otros tres, los que a su vez no se detectaban diferentes ($P>0,05$).

Cuando se valora la bondad de una dieta para el crecimiento, proceso determinado desde un punto de vista nutritivo, especialmente por el contenido y calidad de la proteína, los parámetros más simples que pueden indicarnos un distinto comportamiento entre dietas, son el IT y CEE, para lo que se necesita controlar sólo la ingesta y peso alcanzado, así como conocer el contenido proteico de cada dieta. Los resultados obtenidos en nuestro estudio en relación con dichos parámetros, indican claramente que la grasa procedente de leche de cabra es capaz de determinar una mejor utilización de la proteína dietética. En efecto, el mayor contenido en triglicéridos de cadena media (MCT), existentes en la leche de cabra frente a la de vaca, determina en razón del proceso digestivo y metabólico que éstos presentan, una rápida y alta disponibilidad energética, que puede aprovecharse para diferentes procesos, entre ellos para la síntesis de proteína (Boza y Sanz Sampelayo, 1997; Haenlein, 2001, 2004). Junto a esto, que la calidad de la proteína de la leche de vaca parezca resultar peor que la de cabra, es un aspecto que analizamos en los apartados siguientes de manera extensa,

comentando sólo aquí cómo su particular composición aminoacídica y en las fracciones más características de una proteína láctea, establece una peor utilización sobre todo a nivel digestivo, lo que determina que los índices aquí considerados resulten mejores. En este sentido, López Aliaga y colaboradores (2003) al analizar unas dietas en las que parte de su proteína procedía bien de leche de cabra o vaca, obtienen unos CEC e IT mejores, en el caso de consumo de la dieta que incluía proteína de leche de cabra.

Resultados y discusión

Tabla 9.- Ingesta de alimento (g MS/día), coeficientes de eficacia en crecimiento (CEC; Δ peso/ingesta de proteína) e índices de transformación del alimento (IT; ingesta materia seca/ Δ peso). Efectos de la fuente de proteína y grasa

Grasa	Proteína				DER	Nivel de significación		
	Leche de cabra		Leche de vaca			Efecto proteína (P)	Efecto grasa (G)	P x G
	Leche de cabra	Leche de vaca	Leche de cabra	Leche de vaca				
Ingesta	12,20	12,11	12,15	12,74	0,76	NS	NS	NS
CEC	3,42	3,38	3,50	3,18	0,15	NS	**	*
IT	2,92	2,94	2,86	3,17	0,17	NS	*	*

DER: Desviación estándar residual

NS: No significativo ($P > 0,05$); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

4.1.6.- Coeficientes de digestibilidad de la materia seca, materia orgánica, proteína, grasa, minerales y energía de las dietas experimentales

En la Tabla 10 se recogen los valores deducidos para estos parámetros así como los resultados del análisis estadístico realizado. Tanto el tipo de proteína como de grasa, se mostraban ejerciendo unos efectos principales significativos ($P < 0,05$) tanto sobre la digestibilidad de la materia seca (MS), como de la materia orgánica (MO) y de la energía, deduciéndose en consecuencia, valores medios más altos para el caso de consumo de las dietas cuya proteína y grasa procedían de leche de cabra. Al mismo tiempo se detectaba una interacción significativa ($P < 0,05$) entre factores, la que indicaba cómo el efecto de la fuente proteica, se debía a lo que sucedía exclusivamente, bajo consumo de la dieta igualmente, con grasa de leche de cabra. Junto a esto se deducía un efecto principal significativo ($P < 0,05$) de la fuente de proteína sobre la digestibilidad de la misma, y de la fuente de grasa sobre su digestibilidad. En razón de estos efectos, se infería que la digestibilidad de la proteína resultaba mayor bajo el consumo de las dietas con proteína de leche de cabra y, el de la grasa, bajo la ingesta de las dietas que incluían la grasa de leche igualmente de cabra. Finalmente, la digestibilidad de los minerales se mostraba no afectada por ninguno de los dos factores implicados.

Sobre el valor nutritivo que la leche de cabra presenta respecto de la de vaca, desde hace tiempo se viene sugiriendo que la proteína de la de cabra resulta más digestible, ya que en el estómago llega a producir un coágulo más blando y desmoronable, lo que permite que las proteasas estomacales actúen más fácilmente, favoreciendo en consecuencia, la digestibilidad (Chandan y col., 1968; Devendra y Barus, 1970; Park, 1994). Este distinto comportamiento de la proteína de la leche de cabra frente a la de vaca, parece ser debido a su distinta composición en cuanto a las fracciones caseínicas, presentando en este sentido la proteína de leche de vaca, una proporción mayor de α_{S1} -caseína, y la de cabra, junto a cantidades menores de esta última, una más alta de α_{S2} -caseína. La identificación en la especie caprina de un alto polimorfismo genético ligado a los niveles de α_{S1} -caseína en leche, ha sido la causa por la que el distinto comportamiento de las fracciones caseínicas a nivel estomacal, ha

podido ser puesto de manifiesto (Boulanger y col., 1984; Haenlein, 2001, 2004). Con respecto al efecto que la naturaleza de la grasa de la leche de cabra puede ejercer sobre la digestibilidad de su proteína, Auroseau y colaboradores (1989), comentan que los triglicéridos de cadena media pueden dar lugar a una mayor digestibilidad de la misma, ya que la hidrólisis de ellos a nivel estomacal, facilitaría una mayor degradabilidad de la proteína contenida en el coágulo que engloba ambos nutrientes.

En relación con lo indicado, distintos estudios clínicos realizados en niños que presentaban intolerancia a la proteína de la leche de vaca, dieron a conocer cómo la sustitución de ésta por la leche de cabra, originaba una mejor aceptación y utilización digestiva (Fabre, 1997; Grzesiak, 1997; Reinert y Fabre, 1997), concluyendo los autores, que la proteína de la leche de cabra resulta más tolerable y digestible que la de leche de vaca. Recientemente, López Aliaga y colaboradores (2003) utilizando en ratas unas dietas basadas en parte con leche de cabra o vaca, obtienen en el primer caso, una digestibilidad de la proteína más alta, comentando cómo en general, la proteína de la leche de cabra presenta menos caseína y en consecuencia más proteínas séricas, las que resultan más solubles y por lo tanto, probablemente más digestibles. En este estudio se deduce que la digestibilidad de la proteína, quedaba establecida de manera independiente por el origen de la misma, no influyendo al respecto para nada, la naturaleza de la grasa, resultando mayor bajo consumo de las dietas con proteína de leche de cabra. De acuerdo con los distintos aspectos de composición proteica aquí tenidos en cuenta, creemos poder decir que especialmente, el diferente contenido en α_{S1} -caseína, determinaba la mayor digestibilidad de la proteína de la leche de cabra, pues si bien la proporción de proteína sérica resultaba algo más alta que la que mostraba la de vaca, la diferencia no puede considerarse muy significativa. Por lo tanto, la proteína de la leche de cabra resulta por su naturaleza más digestible, absorbiéndose sus aminoácidos más eficientemente que los de la proteína de leche de vaca.

En relación con la digestibilidad de la grasa, desde hace tiempo se conoce que la de leche de cabra resulta más digestible que la de vaca. La primera razón indicada al respecto, era la de estar la grasa de la leche de cabra constituida por glóbulos mucho más

pequeños, cuyo diámetro es de 1,5-3,0 μm , a diferencia del de la grasa de leche de vaca, cuyo tamaño medio es de 4,0 μm (Fahmi y col., 1956), mostrando en consecuencia, una mayor superficie frente a las lipasas, resultando de ese modo, más fácil su digestión. Además su mayor contenido en triglicéridos de cadena corta y media, determinan igualmente, un mejor aprovechamiento a nivel digestivo, ya que las lipasas atacan las uniones ésteres de dichos ácidos grasos, más eficientemente, haciendo que el proceso de digestión resulte más rápido y eficiente (Jenness , 1980; Haenlein, 2001), informando en este sentido Boza y Sanz Sampelayo (1997) cómo los triglicéridos de cadena corta y media siguen una vía de utilización digestiva y metabólica, diferente de los de cadena larga, ya que los ácidos grasos libres derivados de su hidrólisis, son capaces de ser absorbidos sin reesterificación en las células intestinales, entrando directamente en el sistema Porta. Su bajo peso molecular y su hidrosolubilidad, facilitan la acción de los enzimas digestivos haciendo que su hidrólisis sea más rápida y completa que la de los de cadena larga, comenzando a diferencia de éstos, su digestión en el estómago, ya que la lipasa gástrica, prácticamente sin acción sobre los triglicéridos de cadena larga, inicia la hidrólisis de los de cadena corta y media, en el estómago, la que será completada por la lipasa pancreática a un ritmo cinco veces superior a la hidrólisis de los triglicéridos de cadena larga (García Unciti, 1996). Alférez y colaboradores (2001), al utilizar en la rata unas dietas en las que la totalidad de su grasa procedía de leche de cabra o vaca, obtienen una digestibilidad mayor en el primer caso, lo que los autores achacan tanto al tamaño de los glóbulos de dicha grasa como a su contenido en triglicéridos de cadena media.

En nuestro caso, se deducía para la digestibilidad de la grasa, un efecto independiente de su origen, efecto por el que el valor correspondiente a la leche de cabra, resultaba más alta que la de vaca. Además del efecto del tamaño del glóbulo de grasa, según especie, que sin duda tuvo que darse, el resultado aquí obtenido se debería al distinto perfil en ácidos grasos de ambos tipos de grasa, aspecto en nuestro caso determinado en las dos clases de grasas utilizadas.

Junto a lo indicado, en nuestro estudio se deducía también, un efecto tanto de la grasa como de la proteína de la dieta, sobre la digestibilidad de la materia seca, materia orgánica y energía. De acuerdo con la interacción igualmente detectada entre la fuente de proteína y grasa, se deducía cómo ya hemos indicado, que para el caso de estos coeficientes, el efecto de la proteína se detectaba sólo cuando a la proteína de leche de cabra le acompañaba, igualmente, la grasa de leche de cabra. Al englobar la materia seca, materia orgánica y energía, tanto a la proteína como a la grasa e hidratos de carbono, resulta lógico suponer que los efectos logrados sobre sus digestibilidades serían la resultante de los efectos ejercidos sobre cada uno de estos nutrientes. Por lo tanto y dado que como hemos comentando, la digestibilidad de la proteína y grasa quedaba determinada de manera independiente, bien por la fuente de proteína y grasa de la dieta, respectivamente, el que la digestibilidad de la materia seca, materia orgánica y energía, quedara establecida por la fuente de proteína según la grasa que le acompañaba, podría reflejar que la digestibilidad de los hidratos de carbono, dependería de la fuente de proteína y también de la grasa. En este sentido, Boza y Sanz Sampelayo (1997) comentan cómo la mayor tolerancia que la lactosa de la leche de cabra parece presentar frente a la de vaca, podría ser un efecto debido a la naturaleza del coágulo estomacal formado y a la liberación y utilización a nivel intestinal, de los distintos nutrientes que dicho coágulo engloba, sobre lo que influiría no sólo la naturaleza de la proteína sino también la de la grasa. Junto a esto, Auroseau y colaboradores (1989), al comentar los efectos que los triglicéridos de cadena media tenían sobre el aprovechamiento de los lactorreemplazantes en el cordero, deducen una mayor digestibilidad de la energía cuando la grasa utilizada incluía este tipo de compuestos.

Por primera vez y de acuerdo con estos resultados, tenemos que resaltar la importancia de identificar efectos que podrían darse sólo cuando en el alimento en cuestión, concurrieran tanto la proteína como la grasa de la leche de cabra. El interés de estos resultados radica en el hecho de que hoy día tanto la leche como sus productos derivados, pueden referirse o estar elaborados tanto con una leche entera, semidesnatada o desnatada.

Finalmente se conoce cómo la absorción de los principales minerales de una dieta basada en parte, en leche de cabra, resulta más alta que los de otra dieta con leche de vaca, efectos que se justifican en razón de que tanto la grasa como la proteína de la leche de cabra, podrían en razón de su composición, influir de manera positiva sobre los mecanismos de absorción activa (Barrionuevo y col., 2002; Campos y col., 2003; López Aliaga y col., 2003). A pesar de esto, en nuestro caso, la absorción total mineral, no se mostró afectada por ninguno de los dos factores implicados.

Resultados y discusión

Tabla 10.- Coeficientes de digestibilidad de la materia seca (MS), materia orgánica (MO), grasa y minerales. Efectos de la fuente de proteína y grasa

Grasa	Proteína				DER	Nivel de significación		
	Leche de cabra		Leche de vaca			Efecto proteína (P)	Efecto grasa (G)	P x G
	Leche de cabra	Leche de vaca	Leche de cabra	Leche de vaca				
MS	97,01	92,84	95,41	93,34	0,51	**	***	***
MO	97,28	93,10	95,63	93,55	0,53	**	***	***
Proteína	97,10	96,80	94,10	94,30	0,70	***	NS	NS
Grasa	96,83	91,41	95,89	90,88	1,26	NS	***	NS
Energía	96,97	92,80	95,37	93,31	0,49	**	***	***
Minerales	87,58	87,37	87,40	87,56	0,64	NS	NS	NS

DER: Desviación estándar residual

NS: No significativo ($P > 0,05$); ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.1.7.- Contenidos en energía digestible y metabolizable de las dietas experimentales

En la Tabla 11 se presentan los valores correspondientes a los contenidos tanto en energía digestible (ED; kJ/g MS) como en energía metabolizable (EM; kJ/g MS) de las cuatro dietas utilizadas, según la fuente de proteína y grasa de las mismas. El tipo de grasa aparecía ejerciendo un efecto principal significativo ($P < 0,05$), deduciéndose en consecuencia, valores mayores para el caso del consumo de las dietas que incluían la grasa de la leche de cabra. Junto a esto, se detectaba igualmente, una interacción entre factores significativa ($P < 0,05$), indicativa de que el efecto de la grasa se ejercía principalmente, cuando a la de leche de cabra le acompañaba la proteína igualmente, de leche de cabra.

Al representar estos valores el contenido no sólo en nutrientes digestibles totales, caso de la energía digestible, sino también de los disponibles a nivel metabólico, caso de la energía metabolizable, los resultados aquí deducidos ponen de manifiesto la supremacía de la leche de cabra frente a la de vaca, en razón de la naturaleza tanto de su proteína como de su grasa, tal como se ha comentado en el apartado anterior y se discute en los siguientes.

Resultados y discusión

Tabla 11.- Contenidos en energía digestible (ED; kJ/g MS) y energía metabolizable (EM; kJ/ g MS) de las dietas. Efectos de la fuente de proteína y grasa

Grasa	Proteína				DER	Nivel de significación		
	Leche de cabra		Leche de vaca			Efecto proteína (P)	Efecto grasa (G)	P x G
	Leche de cabra	Leche de vaca	Leche de cabra	Leche de vaca				
ED	18,74	18,06	18,63	18,19	0,10	NS	***	**
EM	18,16	17,50	18,05	17,62	0,11	NS	***	**

DER: Desviación estándar residual

NS: No significativo (P>0,05); ** P<0,01; *** P<0,001

4.1.8.- Valores de ingesta, excreción y balances de N según dieta consumida

En la Tabla 12 se presentan los valores de ingesta, excreción y balance de N según dieta consumida, así como los resultados del análisis estadístico realizado. Lo primero a indicar es cómo al advertir que las ingestas no se vieron afectadas por el tipo de dieta, el resto de valores considerados se analizaron estadísticamente, utilizando las ingestas correspondientes como valor de covarianza (Steel y Torrie, 1984), consignándose en la Tabla en el caso de detectarse un efecto significativo de la misma, los valores medios corregidos. Los valores de ingesta, excreción por heces y orina, N aparentemente digerido y el retenido a nivel corporal, cantidades todas expresadas como $\text{g/kg}^{0,75}$ por animal y día, resultaron en un principio, afectados de manera significativa ($P < 0,05$), por el factor de covarianza. Por el contrario, las relaciones establecidas entre algunas de las cantidades anteriores, se mostraban no afectadas ($P > 0,05$), por dicha covarianza.

Junto a esto, la fuente de proteína aparecía ejerciendo un efecto principal significativo ($P < 0,05$) sobre la excreción de N por heces, cantidad del mismo aparentemente absorbida, N retenido a nivel corporal, relación existente entre la cantidad absorbida e ingerida así como entre la retenida frente a la ingerida o absorbida. De acuerdo con esto, se deducía cómo la excreción de N por heces resultaba más baja cuando la proteína de la dieta procedía de leche de cabra, sucediendo lo contrario respecto del resto de parámetros indicados. Al mismo tiempo, la fuente de grasa se mostraba igualmente, ejerciendo un efecto principal significativo ($P < 0,05$) tanto sobre la excreción de N por orina como sobre la cantidad retenida a nivel corporal, así como sobre las relaciones existentes entre el retenido e ingerido y, retenido y digerido. De acuerdo con esto, se deducía un valor medio de excreción de N por orina, más bajo ($P < 0,05$) para el caso de consumo de la grasa procedente de leche de cabra, sucediendo lo contrario ($P < 0,05$), en relación con el resto de valores indicados. Junto a esto, la interacción entre los dos factores implicados, se mostraba significativa ($P < 0,05$), para el caso de excreción de N por orina, detectándose igualmente, esta interacción entre factores, a unos niveles de significación cercanos al estadísticamente válido, para la cantidad de N retenido a nivel corporal ($P = 0,10$) y relaciones existentes entre el N retenido y el ingerido

($P=0,10$) o digerido ($P=0,07$). De acuerdo con estas interacciones, se deduce que si bien tanto la excreción de N por orina como la relación existente entre N retenido y N digestible, no quedaban en principio, afectadas por la fuente de proteína de las dietas ($P>0,05$), los valores medios correspondientes a la formada por proteína de leche de cabra – grasa de leche de vaca, resultaban menores ($P<0,05$) y mayores ($P=0,07$) respectivamente, que los correspondientes a la dieta constituida por proteína de leche de vaca – grasa de leche de vaca. Respecto de los valores de N retenido y relación existente entre el N retenido y el ingerido, se deducen unos efectos principales tanto de la fuente de proteína como de grasa, efectos que resultan cuantitativamente similares, lo que determina que los valores correspondientes a la dieta formada por proteína de leche de cabra – grasa de leche de vaca y, proteína de leche de vaca – grasa de leche de cabra, tiendan ($P=0,10$) a ser no diferentes.

Février y colaboradores (1993) llevan a cabo unos ensayos con el fin de establecer el valor nutritivo de la leche de cabra frente a la de vaca. Para ello alimentan a lechones con cebada fortificada con vitaminas y minerales, más leche UHT bien de cabra o vaca. Al no obtener diferencias en el crecimiento de los animales, los autores dicen no existir diferencias en el valor nutritivo de ambos tipos de leche. Estos mismos autores realizan más tarde (Février y col., 2000), otro estudio también en lechones, tendente a analizar el valor nutritivo igualmente, de la leche de cabra frente a la de vaca, utilizando en este caso, leche de vaca, junto a dos de cabra, según su nivel, alto o bajo de α_{S1} -caseína, leches que no habían sido sometidas a ningún proceso previo, las que se administraban a igual volumen. De los resultados obtenidos, deducían que el crecimiento en cada caso alcanzado, quedaba determinado sólo de acuerdo con la ingesta energética correspondiente. Recientemente, López Aliaga y colaboradores (2003), al utilizar en ratas, unas dietas cuya proteína procedía en parte, de leche de cabra o vaca, deducen unos balances de N más altos para el caso de consumo de la dieta que incluía la leche de cabra, lo que atribuyen a la mejor solubilidad de la proteína de esa leche, lo que determinaría, sobre todo, un mejor aprovechamiento a nivel digestivo. Como es fácil deducir, en ninguno de estos estudios se realiza una verdadera valoración de la proteína de ambos tipos de leche. Con el fin de abordar este objetivo, se

diseñaron los ensayos cuyos resultados aquí se presentan, pretendiendo al respecto, deducir el efecto que tanto la proteína como la grasa de cada clase de leche, podían llegar a tener sobre la utilización de la proteína, aspecto que analizamos por medio del estudio de los valores más indicativos de la utilización del N. Para esto y con el fin de asegurar que la proteína incluida en la dieta fuera utilizada con fines anabólicos y no como fuente de energía, el porcentaje de la misma fue del 10%, de acuerdo con las indicaciones de la UNU (1980) para este tipo de valoración.

De los resultados incluidos en este apartado, se deduce en un principio, que la naturaleza de la proteína, establece su aprovechamiento digestivo, aspecto comentado en la sección anterior, hecho que determina el que tanto la excreción de N por heces como la relación entre N digestible y N ingerido, resultan de manera independiente, afectados por la fuente de proteína. Por el contrario, al pasar a considerar la utilización a nivel metabólico, se deducen valores indicativos de influir al respecto, la fuente de grasa dependiendo de la correspondiente de proteína, obteniéndose en consecuencia, los mejores valores, bajo consumo de la dieta con proteína y grasa de leche de cabra (N retenido) y/o los peores, bajo ingesta de la que incluía la proteína y grasa de leche de vaca (N de la orina, N retenido y N retenido en relación con el ingerido o digerido), pudiendo aparecer sin diferencias, los valores correspondientes a las dietas formadas por: proteína de leche de cabra – grasa de leche de vaca y, proteína de leche de vaca – grasa de leche de cabra (N retenido y N retenido en relación con el ingerido).

El efecto beneficioso de la grasa de la leche de cabra, sobre la utilización metabólica del N, puede ser debido a su particular composición, en la que intervienen los triglicéridos de cadena media (MCT). Ya hemos comentado cómo estos compuestos se utilizan a nivel digestivo de manera diferente a como lo hacen los triglicéridos de cadena larga, resultando fácil y eficientemente absorbidos. A esa digestión le sigue un rápido catabolismo oxidativo, ya que los ácidos grasos de cadena corta y media, una vez absorbidos, son por el sistema Porta, llevados al hígado y otros tejidos periféricos, no precisando del sistema carnitina, para ser metabolizados a nivel de la mitocondria (Leyton y col., 1987; Arousseau y col., 1989;

Velázquez y col., 1996; Matsuo y Takeuchi, 2004). En base a una serie de ensayos llevados a cabo con cabritos prerrumiantes, se ha llegado a deducir de manera clara, el particular metabolismo de los ácidos grasos contenidos en los MCT, en el sentido de mostrar una fuerte resistencia a ser depositados a nivel corporal, siendo más bien oxidados o elongados a nivel del hígado (Potchoiba y col., 1990; Yeom y col., 2002; Sanz Sampelayo y col., 2006a). El más alto crecimiento conseguido por los animales, así como su mejor desarrollo muscular e incluso, balances de N, indicaban la ayuda que estos compuestos pueden llegar a ejercer sobre la utilización de la proteína de la dieta (Auroseau y col., 1989; Sanz Sampelayo y col., 2006a).

Por lo tanto, si consideramos los valores de N retenido o la relación existente entre el N retenido y el ingerido (lo que se conoce como utilización neta de la proteína), como los más indicativos de su utilización, se observa cómo lo ideal sería contar con la proteína de leche de cabra junto a su grasa. Al mismo tiempo, y dado que de acuerdo con las propiedades que se le atribuyen, actualmente se tiende a emplear leche de cabra en la alimentación infantil, podríamos considerar lo que sucedería, respecto de la utilización de la proteína, si se partiera de una leche de cabra entera, semidesnatada o desnatada. La alta digestibilidad estaría asegurada, pero por el contrario, la utilización de la proteína digestible a nivel metabólico, dependería según lo aquí deducido, de la presencia o no de su grasa.

Resultados y discusión

Tabla 12.- Valores de ingesta y balances de N ($\text{g}/\text{kg}^{0.75}$ · día). Relaciones indicativas de su utilización. Efectos de la fuente de proteína y grasa

Grasa	Proteína				DER	Nivel de significación		
	Leche de cabra		Leche de vaca			Efecto proteína (P)	Efecto grasa (G)	P x G
	Leche de cabra	Leche de vaca	Leche de cabra	Leche de vaca				
NI	1,119	1,120	1,121	1,170	0,045	NS	NS	NS
NH	0,034	0,038	0,067	0,062	0,007	***	NS	NS
NO	0,420	0,437	0,410	0,466	0,024	NS	***	*
ND	1,099	1,095	1,065	1,070	0,007	***	NS	NS
NR	0,679	0,659	0,656	0,604	0,024	***	**	NS
ND/NI	0,971	0,968	0,941	0,943	0,007	***	NS	NS
NR/NI	0,600	0,581	0,579	0,535	0,020	***	***	NS
NR/ND	0,617	0,601	0,615	0,567	0,021	*	***	NS

NI: N ingerido; NH: N de las heces; NO: N de la orina; ND: N digestible ($\text{ND} = \text{NI} - \text{NH}$); NR: N retenido ($\text{NR} = \text{ND} - \text{NO}$); DER: Desviación estándar residual; NS: No significativo ($P > 0,05$); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.1.9.- Valores de ingesta, excreción y retención de energía según dieta consumida

En la Tabla 13, se presentan los valores correspondientes a las ingestas de energía, excreción por heces y orina, cantidades disponibles tanto a nivel digestivo (energía digestible) como metabólico (energía metabolizable), energía retenida a nivel corporal, tanto total como en forma de proteína y grasa, producción de calor total así como el asociado a la utilización de proteína y grasa, junto a las relaciones existentes entre la ingesta de energía digestible y energía bruta y entre la energía total retenida y la ingesta de energía metabolizable. Respecto a los resultados obtenidos del análisis estadístico practicado, lo primero a indicar es que si bien la ingesta de energía bruta no se veía afectada de manera significativa por ninguno de los factores implicados, se detectaba un efecto de la fuente de grasa a $P=0,09$, razón por la que a diferencia de lo realizado al analizar los datos indicativos de la utilización del N, en este caso las ingestas correspondientes no se utilizaron como factor de covarianza.

La fuente de proteína de la dieta aparecía ejerciendo un efecto principal significativo ($P<0,05$) sobre la relación existente entre la ingesta de energía bruta y energía digestible, efecto por el que se deducía cómo el valor medio correspondiente al consumo de las dietas con proteína de leche de cabra, resultaba más alto que el alcanzado por las que incluían proteína de leche de vaca. Junto a esto, la cantidad de energía retenida como proteína, se veía afectada por dicho factor a un nivel de $P=0,06$, lo que mostraba que bajo consumo de las dietas con proteína de leche de cabra, los valores correspondientes tendían a ser más altos que cuando la fuente de proteína era de leche de vaca. El origen de la grasa de las dietas, aparecía ejerciendo un efecto principal significativo ($P<0,05$), sobre la excreción de energía por heces, energía total retenida, energía retenida como grasa, relaciones existentes entre la ingesta de energía bruta y energía digestible y, energía total retenida y energía metabolizable, así como sobre la producción de calor, asociado tanto a la utilización de proteína como de grasa. De acuerdo con estos efectos, se deducía que tanto la pérdida de energía por heces como la energía total retenida, energía retenida como grasa, relación existente entre la energía total

retenida e ingesta de energía metabolizable, y la producción de calor asociada a la utilización de proteína, resultaban ser cantidades más bajas en el caso de consumo de las dietas cuya grasa procedía de leche de cabra, sucediendo lo contrario respecto a la relación existente entre la ingesta de energía digestible y energía bruta y la producción de calor asociada a la utilización de grasa.

Junto a lo anterior se detectaba una interacción entre factores significativa ($P < 0,05$), para la relación existente entre la energía digestible y la bruta ingerida, interacción que indicaba cómo dicha relación resultaba más alta bajo consumo de la proteína de leche de cabra pero sólo cuando la grasa de la dieta procedía, igualmente, de dicha clase de leche. Aunque sin alcanzar un nivel de significación estadísticamente válido, en el caso de las cantidades de ingesta de energía digestible y metabolizable, se detectaba una interacción entre factores a $P = 0,11$, indicativa de que bajo el consumo de las dietas con proteína de leche de cabra, los valores de los parámetros indicados, tendían a ser mayores cuando la grasa procedía igualmente de leche de cabra, sucediendo lo contrario cuando la proteína utilizada era de leche vaca. El primero de estos efectos, indicaría una mejor utilización de la energía ingerida, tanto a nivel digestivo como metabólico, cuando a la proteína de leche de cabra le acompañara la grasa igualmente de leche de cabra. El segundo de los efectos citados, sería meramente reflejo de la mayor ingesta que bajo consumo de la dieta formada por proteína y grasa de leche de vaca, se alcanzaba.

De los resultados obtenidos, lo primero a indicar es que lo comentado respecto del efecto de la fuente de grasa sobre la ingesta energética, podría deberse al distinto sabor que las dietas presentarían según el origen de la misma. En razón de su composición, se conoce que la grasa de la leche de cabra presenta un sabor más fuerte, lo que pudo influir sobre la ingesta de las dietas que la incluían. A pesar de esto, la diferencia más alta alcanzada, fue sólo del 6%. El efecto de la fuente de grasa sobre la excreción de energía por heces, es la resultante de la mayor absorción que de este nutriente tenía lugar cuando las dietas incluían la grasa de leche de cabra, lo que determinaba como ya hemos comentado, su más alta digestibilidad. Al

mismo tiempo, los efectos detectados sobre la relación existente entre la energía digestible y la bruta ingerida, ya han sido discutidos al comentar la digestibilidad de la energía.

Independientemente de los resultados anteriores, los demás obtenidos en relación con la utilización de la energía, son principalmente debidos al particular metabolismo que la grasa de la leche de cabra presenta frente a la de vaca, lo que conduce a una menor retención de energía en forma de grasa, junto a una igualmente menor eficiencia bruta de utilización de la energía metabolizable ingerida para la retención y, mayor producción de calor asociada a la oxidación de grasa. Junto a esto, igualmente se deduce una mejor utilización de la proteína, cuando la de la dieta procede de leche de cabra o cuando la grasa procede de igual manera, de dicha clase de leche, aspectos que determinan una mayor cantidad de energía retenida como proteína y una menor producción de calor asociada a su oxidación.

La termogénesis inducida por dieta, juega un importante papel en la regulación del balance energético (Trayhurn y col., 1982). La composición en macronutrientes afecta a esta termogénesis y en consecuencia, al flujo total de energía que se pierde a través del organismo (Rothwell , 1979). La naturaleza de la grasa de la dieta, en razón de su composición en ácidos grasos, es capaz de influir sobre la termogénesis inducida por dieta y por tanto, sobre el depósito de grasa a nivel corporal (Shimomura y col., 1990). Como ya hemos comentado, los MCT se metabolizan más rápidamente que los de cadena larga, originando en un corto espacio de tiempo, una descarga de energía.

En ratas alimentadas con una igual cantidad la energía, la ganancia de peso resultaba menor cuando la dieta incluía como fuente de grasa MCT en vez de triglicéridos de cadena larga. Bajo consumo de la dieta con MCT, el depósito de grasa resultaba más bajo mientras que la tasa de metabolismo basal se incrementaba (Senior, 1990). Matsuo y Takeuchi (2004) informan de cómo los MCT presentan un destino metabólico distinto, lo que puede originar la diferencia que estos compuestos presentan a nivel de la termogénesis postprandial. Ya hemos indicado cómo los ácidos grasos contenidos en los MCT, penetran en la mitocondria de las células hepáticas, independientemente de la acil-CoA-carnitina transferasa. El acetil-CoA

formado por la β -oxidación puede ser posteriormente oxidado, vía ciclo de Krebs, hasta anhídrido carbónico y agua (Velázquez y col., 1996). El nivel de enzimas relacionadas con el ciclo de Krebs, las que se emplean como marcadores de la capacidad oxidativa en la mitocondria, resulta más alto bajo consumo de MCT que cuando se ingiere triglicéridos de cadena larga. En opinión de Matsuo y Takeuchi (2004), esta mayor capacidad estaría relacionada con los mecanismos que determinan el menor depósito de grasa inducido por los efectos térmicos de los MCT. Los autores últimamente citados, indican cómo el particular metabolismo de estos compuestos, sugiere que podrían resultar de utilidad en los tratamientos de la obesidad.

Los resultados obtenidos en este estudio, se muestran enteramente de acuerdo con los comentarios anteriores, en relación con el particular metabolismo de los MCT. Junto a un menor depósito de grasa, se deduce una mayor cantidad de pérdida de calor asociada a su oxidación. Al mismo tiempo, esta grasa determina una menor oxidación proteica, identificándose como fuente de energía que ayuda al proceso de su retención.

Con vistas a considerar a la leche de cabra como alimento de elección para la edad infantil, el particular metabolismo de su grasa, daría lugar a un menor desarrollo de células adiposas, lo que determinaría una capacidad menor de desarrollo del tejido adiposo, a edades posteriores.

Resultados y discusión

Tabla 13.- Valores de ingesta y balances de energía (g /kg^{0.75}. día). Relaciones indicativas de su utilización. Efectos de la fuente de proteína y grasa

Grasa	Proteína				DER	Nivel de significación		
	Leche de cabra		Leche de vaca			Efecto proteína (P)	Efecto grasa (G)	P x G
	Leche de cabra	Leche de vaca	Leche de cabra	Leche de vaca				
EB	1304,8	1320,4	1287,2	1366,2	72,14	NS	NS	NS
EH	39,5	95,3	59,2	91,1	18,99	NS	***	NS
EO	39,3	37,7	38,3	39,7	4,75	NS	NS	NS
ED	1265,3	1225,1	1228,0	1275,1	71,02	NS	NS	NS
EM	1226,1	1187,5	1189,6	1235,4	68,95	NS	NS	NS
ER	248,0	266,6	244,8	270,0	15,82	NS	**	NS
ERp	99,8	96,9	95,5	93,3	5,28	NS	NS	NS
ERg	148,1	169,7	149,3	176,7	14,67	NS	***	NS
ED/EB	0,970	0,928	0,954	0,933	0,005	**	***	***
ER/EM	0,202	0,225	0,207	0,219	0,016	NS	**	NS
PCp (% Pct)	2,32	2,89	2,53	3,10	0,51	NS	**	NS
PCg (% Pct)	11,4	8,3	10,8	8,5	1,40	NS	***	NS

EB: Energía bruta; EH: Energía de las heces; EO: Energía de la orina; ED: Energía digestible (ED = EB – EH); EM: Energía metabolizable (EM = ED – EO); ER: Energía retenida; ERp: Energía retenida como proteína; ERg: Energía retenida como grasa (ERg = ER – ERp); PCp: Pérdida de calor asociada a la utilización de proteína (% Pct = Producción de calor total); PCg: Pérdida de calor asociada a la utilización de grasa; DER: Desviación estándar residual; NS: No significativo (P>0,05); ** P<0,01; *** P<0,001

4.1.10.- Pesos vivos finales alcanzados y composición química de los mismos

En la Tabla 14, se presentan los valores de los pesos vivos finales alcanzados por los animales experimentales, así como la composición química de los mismos. Respecto del análisis estadístico llevado a cabo, lo primero a indicar es que al advertir que los pesos vivos no quedaban afectados por ninguno de los dos factores implicados, el resto de parámetros considerados se analizaron en un principio, considerando los valores de pesos vivos como factor de covarianza, factor que en ningún caso resultó estadísticamente significativo ($P > 0,05$), omitiéndose por tanto del análisis.

La fuente de proteína de la dieta, aparecía no ejerciendo efecto significativo alguno ($P < 0,05$), sobre los distintos valores consignados. Sólo en el caso del contenido en proteína del peso vivo, se deducía un efecto de la fuente de proteína de la dieta consumida a $P = 0,10$, efecto indicativo de que bajo el consumo de las dietas cuya proteína procedía de leche de cabra, el contenido proteico del peso vivo tendía a ser más alto. Junto a esto, la fuente de grasa de la dieta, aparecía ejerciendo un efecto significativo ($P < 0,05$) tanto sobre el contenido en MS como sobre el de grasa y energía del peso vivo de los animales, deduciéndose en consecuencia, cómo dichos contenidos resultaban más altos bajo consumo de las dietas cuya grasa procedía de leche de vaca.

Estos resultados se muestran totalmente de acuerdo con los comentarios incluidos en el apartado anterior. Los pesos vivos finales, resultaban no diferentes, indicando un igual crecimiento bajo consumo de las cuatro dietas. Al mismo tiempo, la grasa de leche de cabra, al determinar un menor depósito de energía en forma de grasa, establece unos pesos con un menor contenido de la misma, lo que igualmente se traduce en los resultados deducidos sobre la cantidad de energía contenida en el peso vivo. Junto a esto y conocido que la grasa se deposita de manera bastante anhidra, haciéndolo por el contrario, la proteína junto a una elevada cantidad de agua, lógico resulta el deducir que la grasa de la leche de cabra daba lugar a unos pesos vivos con un menor contenido en materia seca. Finalmente, y aunque aquí se deduce sólo una tendencia, la mejor calidad de la proteína de leche de cabra, determinaba un contenido más alto de la misma en el peso vivo de los animales.

Resultados y discusión

Tabla 14.- Pesos vivos (g) finales alcanzados y composición química (% peso vivo) de los mismos. Efectos de la fuente de proteína y grasa

Grasa	Proteína					Nivel de significación		
	Leche de cabra		Leche de vaca		DER	Efecto proteína (P)	Efecto grasa (G)	P x G
	Leche de cabra	Leche de vaca	Leche de cabra	Leche de vaca				
Peso vivo	155,3	154,4	155,4	152,5	8,06	NS	NS	NS
Composición								
MS	34,51	35,80	34,20	36,50	2,27	NS	*	NS
Proteína	17,64	17,38	16,91	17,16	0,72	NS	NS	NS
Grasa	13,31	15,10	13,44	15,97	1,28	NS	***	NS
Minerales	3,75	3,68	3,67	3,71	0,78	NS	NS	NS
Energía (kJ/g)	9,50	10,14	9,22	10,43	0,56	NS	***	NS

DER: Desviación estándar residual

NS: No significativo ($P > 0,05$); * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$

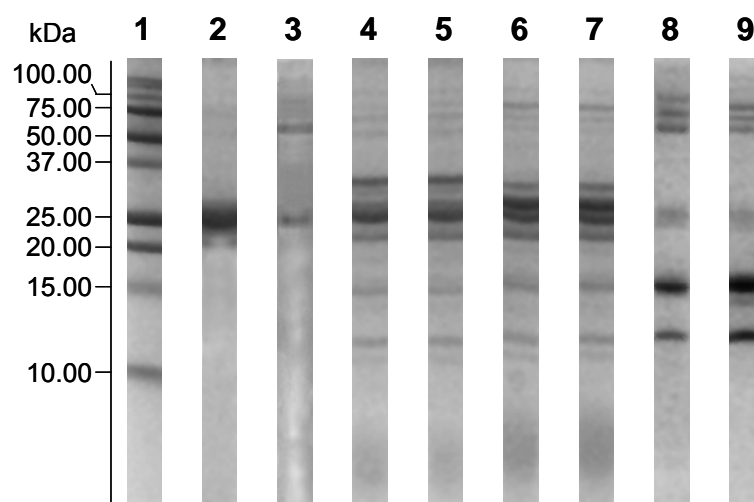
4.2.- Estudio comparativo de la capacidad inmunógena de la leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros

4.2.1.- Determinación del espectro antigénico de la leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros

Obtención de inmunisueros: Técnicas de Inmunodifusión (ID) y ELISA

La determinación del patrón polipeptídico de las cuatro soluciones inmunizantes, que se utilizaron en nuestro estudio para la obtención de los sueros inmunes, se llevó a cabo mediante SDS-PAGE. En la Figura 1 se muestra el perfil proteico obtenido mediante electroforesis, en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, y teñidos con azul Coomassie R-250. El uso de SDS como agente desnaturalizante fue necesario debido a la naturaleza compleja de la leche, cuyos constituyentes se encuentran en parte, en suspensión y en parte en solución, lo que hace que su separación bajo condiciones no desnaturalizantes, sea no satisfactoria (Restani, y col., 2002).

Figura 1.- Perfil proteico determinado por SDS-PAGE de leche de cabra, leche de vaca, lactosuero de leche de cabra y lactosuero de leche de vaca



Carril 1: Marcadores de pesos moleculares; carril 2: Marcador de β -caseína de cabra; carril 3: Marcador IgG

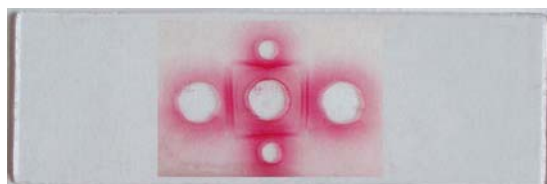
Los pesos moleculares aparentes de los polipéptidos mayoritarios fueron como sigue: en el carril 3, se apreciaban dos bandas mayoritarias en la zona de 24 y 55 kDa, correspondientes a las inmunoglobulinas de cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. En el carril 4 y 5 (LC), aparecían tres bandas minoritarias sobre 84, 64 y 55 kDa que corresponderían a lactoferrina, seroalbúmina y a las cadenas pesadas de IgG. Entre 27 y 24 kDa corresponderían al complejo caseína, y a las cadenas ligeras de las IgG. Por último se apreciaban dos polipéptidos de bajos pesos moleculares, sobre 17 y 13 kDa, que pertenecerían a β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, respectivamente, en sus dos isoformas, normal y glicosilada (Kim y Jiménez-Flores, 1994). En los carriles 6 y 7 (LV) se obtenía en general, el mismo patrón polipeptídico que con LC. Los carriles 8 y 9 (LLC y LLV, respectivamente), tienen presentes en su patrón electroforético, las tres bandas de altos pesos moleculares que corresponderían a: lactoferrina, seroalbúmina y cadenas pesadas de IgG, seguidas de una banda sobre 24 kDa, correspondiente a las cadenas ligeras de las IgG, y dos de bajos pesos moleculares: β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina. Éstas últimas se mostraban cuantitativamente más aumentadas que en la leche, debido a que en los 6 μ g de contenido en proteínas que depositábamos en cada carril, la proporción relativa de éstas, resultaba mayor en los lactosueros.

El patrón obtenido tanto para LC, LV, LLC y LLV está de acuerdo con lo recogido en la literatura referente a los componentes proteicos de los dos tipos de leche y de sus correspondientes lactosueros (Brown y col., 1995).

Para la obtención de los sueros inmunes, hemos seguido la metodología y protocolos ya indicados en Material y métodos. La dinámica de producción de anticuerpos en conejos frente a LC, LV, LLC y LLV, determinada por ELISA e ID, durante el período de inmunización, se muestran en la Tabla 15. El título más alto correspondió al suero inmune frente a LV, y fue de 1/131072. En la Figura 2 se indica la imagen fotográfica de una ID, teñida por rojo Ponceau. En el orificio central, se dispuso LC (como antígeno) y en los exteriores, el inmunisero frente a este antígeno procedente del conejo correspondiente. Cuando se

encuentran los dos inmunorreactivos a la concentración adecuada, se producen las 3 líneas de precipitación.

Figura 2.- Inmunodifusión de la sangría de sacrificio del suero inmune desarrollado frente a leche de cabra



Recurrimos a la técnica de ID para seguir el desarrollo de la producción de anticuerpos en el proceso de inmunización, ya que no disponíamos de sueros positivos frente a nuestras soluciones inmunizantes. Con las primeras sangrías positivas obtenidas mediante ID, se puso a punto la técnica ELISA, la que se utilizó para el seguimiento de la dinámica de producción de anticuerpos.

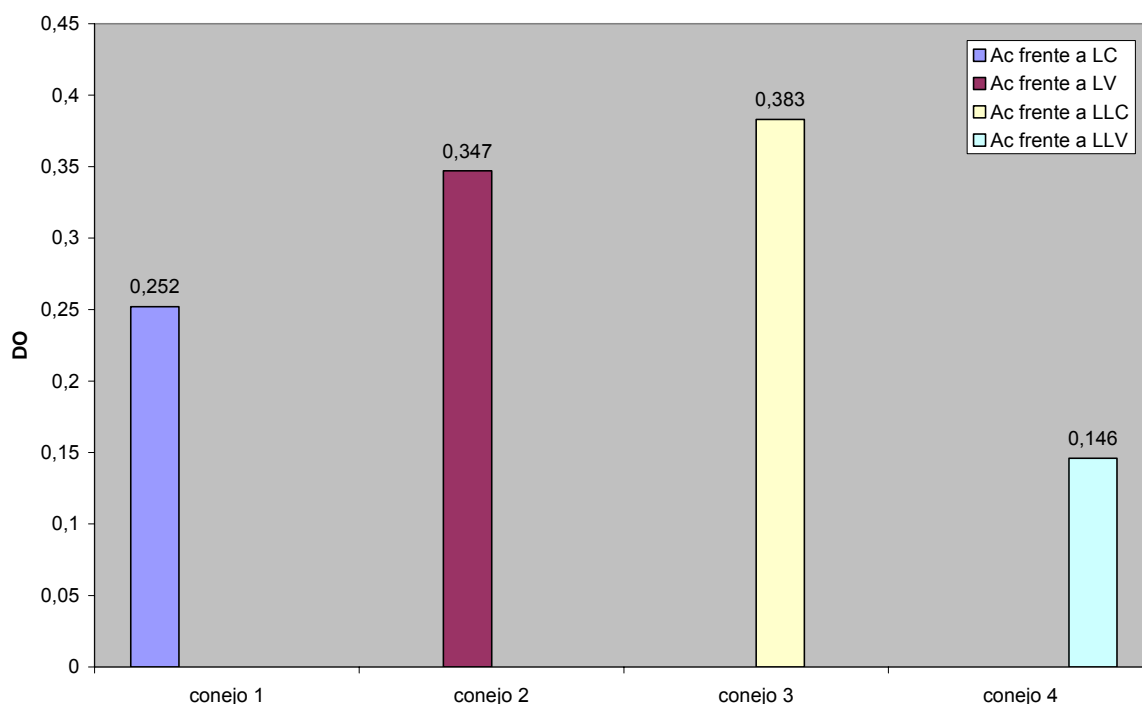
Tabla 15.- Dinámica de los anticuerpos desarrollados en conejos, determinados por ELISA e Inmunodifusión (ID)

	Conejo	Antígeno	Sangría					
			1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
ELISA	1	LC	1/2048	1/4096	1/4096	1/8192	1/32768	1/32768
	2	LV	1/2048	1/2048	1/8192	1/16384	1/65536	1/131072
	3	LLC	1/1024	1/2048	1/8192	1/16384	1/16384	1/132768
	4	LLV	1/2048	1/2048	1/8192	1/8192	1/65536	1/65536
ID	1	LC	-	-	+; 2 líneas	+; 2 líneas	+; 3 líneas	+; 3 líneas
	2	LV	-	+; 1 línea	+; 1 línea	+; 2 líneas	+; 2 líneas	+; 3 líneas
	3	LLC	-	-	+; 1 línea	+; 1 línea	+; 2 líneas	+; 2 líneas
	4	LLV	-	-	+; 2 líneas	+; 2 líneas	+; 2 líneas	+; 2 líneas

LC: Leche de cabra; LV: Leche de vaca; LLC: Lactosuero leche de cabra; LLV: Lactosuero leche de vaca

En la Gráfica 1 están representados los valores de DO de los 4 sueros inmunes en la sangría de sacrificio, y a la dilución 1/4096. La reacción se realizó frente a los mismos

antígenos con los que se inmunizaron los conejos (reacciones homólogas). Los resultados confirmaban que habíamos obtenido unos buenos inmunisueros, con la pauta y vía de inmunización utilizada, los que permitía determinar frente a qué dianas se habían producido los anticuerpos. El valor límite de positividad se calculaba a partir de la sangría 0 de los conejos (como ya se ha descrito en el apartado correspondiente de Material y métodos), siendo estos valores: conejo 1 = 0,066; conejo 2 = 0,093; conejo 3 = 0,086; conejo 4 = 0,071.



Gráfica 1.- Valores de densidad óptica obtenidos por los cuatro sueros inmunes en la sangría de sacrificio a la dilución 1/4092

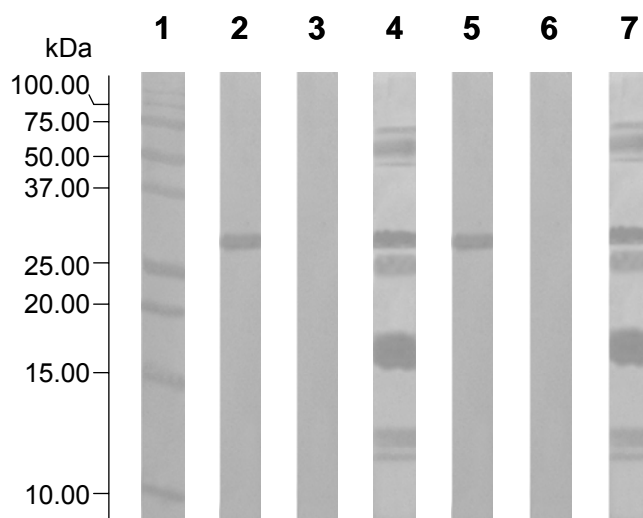
Determinación del espectro antigénico mediante la técnica de Western blot

Las Figuras 3 y 4 muestran los polipéptidos reconocidos por los inmunisueros frente a los antígenos LC, LV, LLC y LLV, (conejos 1, 2, 3 y 4), después de ser separados por electroforesis en geles de poliacrilamida, transferidos al soporte de nitrocelulosa y realizada la reacción inmuno-enzimática.

La Figura 3 recoge los resultados obtenidos para LC y LV. En el carril 1 se muestran los marcadores de pesos moleculares, en el 2 y 5 el marcador de la β -caseína de cabra, en el 3 y 4 LC y, en el 6 y 7 LV. Cada carril se revelaba con los inmunisueros que se indican en el pie de

la figura. Los dos sueros inmunes reconocían el mismo patrón: tres bandas de altos pesos moleculares, entre 75 y 55 kDa, correspondientes a lactoferrina, seroalbúmina y cadenas pesadas de las inmunoglobulinas; otra sobre 27 kDa, correspondiente al complejo caseína, a la que le sigue otra en torno a 24 kDa, cadenas ligeras de las inmunoglobulinas y por último, dos polipéptidos de bajos pesos moleculares, 17 y 13 kDa, que pertenecerían a β -lactoglobulina y a las dos isoformas de α -lactoalbúmina, respectivamente. Bevilacqua y colaboradores (2000, 2001), en cobayas inmunizados por vía oral tanto con leche de cabra como de vaca, determinan mediante ELISA anticuerpos dirigidos frente a las principales fracciones proteicas (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y caseínas) de ambos tipos de leche, obteniendo respuestas frente a cada una de ellas, si bien los títulos obtenidos dependían del tipo de fracción considerada.

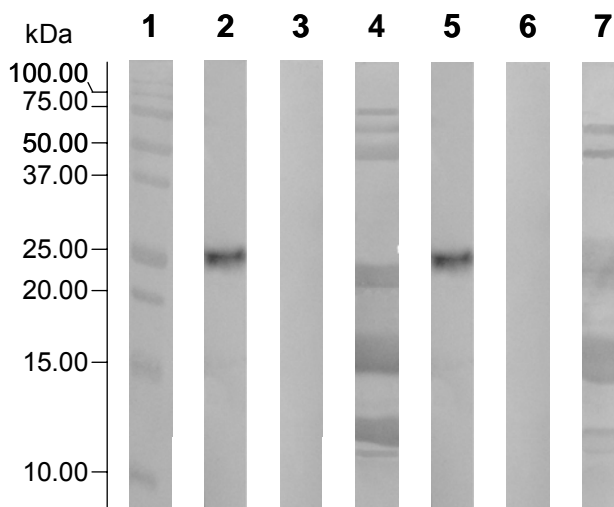
Figura 3.- Polipéptidos antigénicos revelados por la sangría de sacrificio de los inmunisueros obtenidos frente a leche de cabra (LC) y leche de vaca (LV)



Carril 1: marcadores de pesos moleculares; carriles 2 y 4: sangría de sacrificio del inmunisiero frente a LC, carril 3: sangría 0 del inmunisiero frente a LC; carriles 5 y 7: sangría de sacrificio del inmunisiero frente a LV y carril 6: sangría 0 del inmunisiero frente a LV

En la Figura 4 están recogidos los resultados obtenidos para LLC y LLV. En el carril 1, se muestran los marcadores de pesos moleculares, en el 2 y 5 el marcador de la β -caseína de cabra, en el 3 y 4 LLC, y en el 6 y 7, LLV. Cada carril se reveló con los inmunisueros que se indican en el pie de la figura.

Figura 4.- Polipéptidos antigénicos revelados por la sangría de sacrificio de los inmunisueros obtenidos frente a lactosuero de leche de cabra (LLC) y lactosuero de leche de vaca (LLV)



Carril 1: marcadores de pesos moleculares; carriles 2 y 4: sangría de sacrificio del inmunisero frente a LLC; carril 3: sangría 0 del inmunisero frente a LLC; carriles 5 y 7: sangría de sacrificio del inmunisero frente a LLV, carril 6: sangría 0 del inmunisero frente a LLV

Tras la realización de la reacción inmunológica, se revelaban las siguientes bandas (Figura 4): en los carriles 2 y 5 aparecía una banda correspondiente al complejo caseína de aproximadamente 27 kDa. Este resultado nos indica, que los sueros inmunes frente a LLC y LLV contienen anticuerpos de reactividad cruzada con epítomos de la caseína. En los carriles 4 y 7, tres bandas de altos pesos moleculares, entre 75 y 55 kDa, correspondientes a lactoferrina, seroalbúmina y cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (la correspondiente a lactoferrina en el carril 7 era muy débil), otra sobre 24 kDa que correspondería a las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas y por último, otras dos, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, en torno a 17 y 13 kDa respectivamente. La α -lactoalbúmina aparece desdoblada en dos isoformas. Las sangrías cero de ambos conejos, como es lógico, no reconocieron ningún polipéptido antigénico. Los dos inmunisueros producidos frente a LLC y LLV, reconocieron el mismo número de proteínas antigénicas. La única particularidad de esta figura con respecto a la 3, es la ausencia de la banda correspondiente al complejo caseína (carriles 4 y 7), lo que se explica debido a que en los lactosueros, no están presentes las caseínas y por tanto, en los sueros inmunes obtenidos con ellos, no se han producido los anticuerpos frente a ellas. Las bandas correspondientes a β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, resultan más intensas en la

imagen de la Figura 4 que en la de la 3, debido a que en los 3 μ l de volumen de muestra utilizados, la cantidad de proteínas séricas sometida a electroforesis, 6 μ g, era mayor debido a la no existencia de caseínas.

Dado que las fracciones α_{S1} -caseínas y β -lactoglobulina no existen en la leche humana, estas proteínas se consideraron, en un principio, que eran las responsables de la producción de anticuerpos (Boza Puerta, 1992). En una reciente revisión sobre el tema, Park y Haenlein (2006), informan de que en distintos tipos de estudios se ha deducido el desarrollo de anticuerpos frente a las 18 proteínas diferentes presentes en la leche de vaca. Los citados autores, analizan los resultados obtenidos tanto en lactantes como en niños y adultos, indicando que la reacción alérgica parece poder producirse tanto por los distintos tipos de caseína, especialmente la α_{S1} -caseína y β -caseína, como por las diferentes proteínas séricas, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina e inmunoglobulinas.

4.2.2.- Análisis de la capacidad alérgica de leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros: Ensayos *in vivo*

El cobaya es comúnmente usado en los ensayos de alergenidad de tipo I. De hecho, fue inicialmente descrito por Parish y colaboradores (1964), como modelo para estudiar la alergia a las proteínas de la leche de vaca, y ha sido ampliamente utilizado para realizar los ensayos de alergia en fórmulas dirigidas a la alimentación infantil (McLaughlan y col., 1981). Las reacciones anafilácticas, también denominadas de hipersensibilidad inmediata o de tipo I, pueden ser causadas por moléculas de gran tamaño, con capacidad inmunogénica, o por moléculas más pequeñas que se unen a portadores y actúan como haptenos. Para estas reacciones, se utilizan estos animales de experimentación, tanto en modelos sistémicos como locales, sensibilizados de forma activa o pasiva, respectivamente. Las reacciones de tipo I son mediadas principalmente, por inmunoglobulinas de la clase E. Estos anticuerpos son producidos durante las etapas de exposición al antígeno (fase de sensibilización), iniciándose la reacción ante una segunda exposición al mismo. Los síntomas clínicos son consecuencia de la liberación de gran variedad de mediadores (histamina, leucotrienos, tromboxano,

prostaglandinas, etc.), que hacen del choque anafiláctico una de las manifestaciones más críticas y complejas de las reacciones alérgicas.

En el caso de sensibilizar a los cobayas pasivamente, mediante la administración de sueros con anticuerpos, el antígeno provoca tras su inoculación, una reacción antígeno-anticuerpo que induce la liberación local de sustancias vasoactivas, dando lugar a un aumento drástico de la permeabilidad vascular. Como la sustancia antigénica se mezcla con azul Evans, la reacción se evidencia por la aparición de zonas coloreadas. Una reacción mayor de 0,5 cm de diámetro se considera positiva (Pahud y col., 1988).

Prueba de Anafilaxia sistémica para leche de cabra, leche de vaca y para sus lactosueros: Ensayos 1 y 3

El comportamiento nutritivo de los cobayas durante los 22 días que duró el experimento, fue satisfactorio. En el Ensayo 1, la cantidad de LC y LV ingerida por los cobayas de los grupos II y IV, durante los 15 días que siguieron la inmunización oral, se detallan en las Tablas 16 y 17. El valor medio ingerido fue $90,3 \pm 11,0$ ml y $88,2 \pm 10,6$ ml para LC y LV respectivamente, valores que no resultaron estadísticamente diferentes ($P > 0,05$). En el Ensayo 3, la cantidad de LLC y LLV ingerida por los cobayas, de los grupos II y IV, durante los 15 días que siguieron la inmunización oral, se detallan en las Tablas 18 y 19. El valor medio ingerido fue $50,3 \pm 6,7$ ml y $77,7 \pm 14,0$ ml para LLC y LLV respectivamente, resultando mayor el valor medio correspondiente a LLV ($P < 0,05$). El diseño experimental seguido fue indicado en el apartado de Material y métodos, realizándose la prueba de anafilaxia sistémica a los 22 días del inicio del ensayo. A cada animal se le inoculaba por vía venosa, la misma solución antigénica que había bebido para su sensibilización oral. En todos los animales se observaron los siguientes síntomas de hipersensibilidad: se frotaban intensamente la nariz y la cabeza, hinchazón alrededor de los ojos, respiración jadeante, cianosis alrededor de boca y rabo, y en su caso, choque anafiláctico. Los resultados se muestran en la Gráfica 2.

Resultados y discusión

Tabla 16.- Volumen en ml de leche de cabra, ingerida diariamente por los cobayas, junto con sus medias por animal y día

Días	Cobayas								Media	DE
	17	18	19	20	21	22	23	24		
1	38,0	70,0	79,0	58,0	79,0	51,0	73,0	66,0	64,3	14,40
2	63,0	57,0	34,0	60,0	57,0	44,0	67,0	51,0	54,1	10,78
3	65,0	71,0	42,0	59,0	61,0	55,0	45,0	51,0	56,1	9,88
4	80,0	95,0	90,0	82,0	98,0	72,0	60,0	90,0	83,4	12,68
5	88,0	93,0	90,0	88,0	86,0	68,0	76,0	82,0	83,9	8,25
6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	61,0	100,0	95,1	13,79
7	40,0	123,0	11,0	97,0	88,0	95,0	69,0	75,0	74,8	35,28
8	110,0	120,0	115,0	118,0	115,0	106,0	85,0	58,0	103,4	21,41
9	110,0	118,0	116,0	135,0	87,0	138,0	107,0	66,0	109,6	23,85
10	115,0	112,0	36,0	150,0	107,0	105,0	20,0	42,0	85,9	46,61
11	80,0	125,0	110,0	127,0	111,0	92,0	84,0	70,0	99,9	21,36
12	115,0	140,0	115,0	118,0	85,0	106,0	75,0	67,0	102,6	24,77
13	124,0	150,0	150,0	144,0	128,0	105,0	115,0	55,0	121,4	31,43
14	129,0	145,0	145,0	105,0	150,0	82,0	48,0	80,0	110,5	37,72
15	106,0	140,0	125,0	121,0	130,0	85,0	115,0	55,0	109,6	27,61
Media	90,9	110,6	90,5	104,1	98,8	86,9	73,3	67,2		
DE	29,07	28,94	42,25	30,20	25,50	25,37	26,11	16,02		

DE = Desviación estándar

Resultados y discusión

Tabla 17.- Volumen en ml de leche de vaca, ingerida diariamente por los cobayas, junto con sus medias por animal y día

Días	Cobayas								Media	DE
	25	26	27	28	29	30	31	32		
1	70,0	71,0	95,0	56,0	41,0	70,0	73,0	71,0	68,4	15,36
2	90,0	64,0	62,0	73,0	60,0	50,0	47,0	56,0	62,8	13,70
3	66,0	45,0	60,0	82,0	90,0	38,0	50,0	88,0	64,9	20,08
4	74,0	70,0	60,0	82,0	90,0	38,0	58,0	72,0	68,0	16,04
5	92,0	77,0	89,0	90,0	90,0	85,0	54,0	74,0	81,4	12,85
6	72,0	77,0	100,0	90,0	100,0	88,0	61,0	87,0	84,4	13,60
7	45,0	86,0	123,0	108,0	61,0	86,0	62,0	106,0	84,6	27,04
8	108,0	104,0	56,0	103,0	121,0	120,0	85,0	40,0	92,1	29,75
9	106,0	112,0	112,0	123,0	130,0	100,0	80,0	110,0	109,1	15,06
10	91,0	75,0	100,0	112,0	146,0	101,0	70,0	105,0	100,0	23,58
11	90,0	100,0	85,0	126,0	8,0	97,0	100,0	75,0	85,1	34,49
12	92,0	100,0	143,0	130,0	131,0	88,0	95,0	112,0	111,4	20,88
13	125,0	105,0	150,0	130,0	125,0	122,0	37,0	136,0	116,3	34,46
14	129,0	110,0	124,0	102,0	69,0	136,0	110,0	127,0	113,4	21,30
15	130,0	101,0	102,0	102,0	140,0	75,0	0,0	0,0	81,3	53,88
Media	92,0	84,5	97,4	100,6	93,5	86,3	65,5	83,9		
DE	24,58	19,78	29,82	21,94	39,94	29,01	27,53	35,08		

DE = Desviación estándar

Resultados y discusión

Tabla 18.- Volumen en ml de lactosuero de leche de cabra, ingerido diariamente por los cobayas, junto con sus medias por animal y día

Días	Cobayas								Media	DE
	17	18	19	20	21	22	23	24		
1	30,0	7,0	5,0	8,0	0,0	4,0	0,0	13,0	8,4	9,72
2	47,0	43,0	49,0	43,0	73,0	66,0	45,0	50,0	52,0	11,25
3	40,0	50,0	38,0	48,0	50,0	42,0	27,0	55,0	43,8	11,25
4	61,0	40,0	55,0	45,0	51,0	44,0	36,0	37,0	46,1	9,96
5	52,0	59,0	32,0	42,0	52,0	51,0	58,0	61,0	50,9	9,69
6	67,0	57,0	44,0	48,0	81,0	42,0	31,0	48,0	52,3	15,71
7	51,0	39,0	43,0	56,0	91,0	70,0	31,0	62,0	55,4	19,13
8	37,0	65,0	82,0	51,0	63,0	27,0	36,0	45,0	50,8	18,26
9	81,0	57,0	60,0	45,0	70,0	30,0	36,0	60,0	54,9	17,07
10	31,0	48,0	65,0	46,0	87,0	63,0	31,0	43,0	51,8	19,01
11	70,0	40,0	70,0	49,0	83,0	43,0	37,0	42,0	54,3	17,43
12	66,0	52,0	59,0	50,0	79,0	53,0	23,0	52,0	54,3	15,94
13	70,0	42,0	85,0	65,0	92,0	60,0	37,0	61,0	64,0	18,90
14	59,0	57,0	80,0	70,0	75,0	55,0	25,0	50,0	58,9	17,22
15	69,0	48,0	74,0	55,0	75,0	55,0	30,0	51,0	57,1	15,17
Media	55,4	46,9	56,1	48,1	68,1	47,0	32,2	48,7		
DE	15,76	13,65	21,68	13,58	23,34	17,13	12,33	12,45		

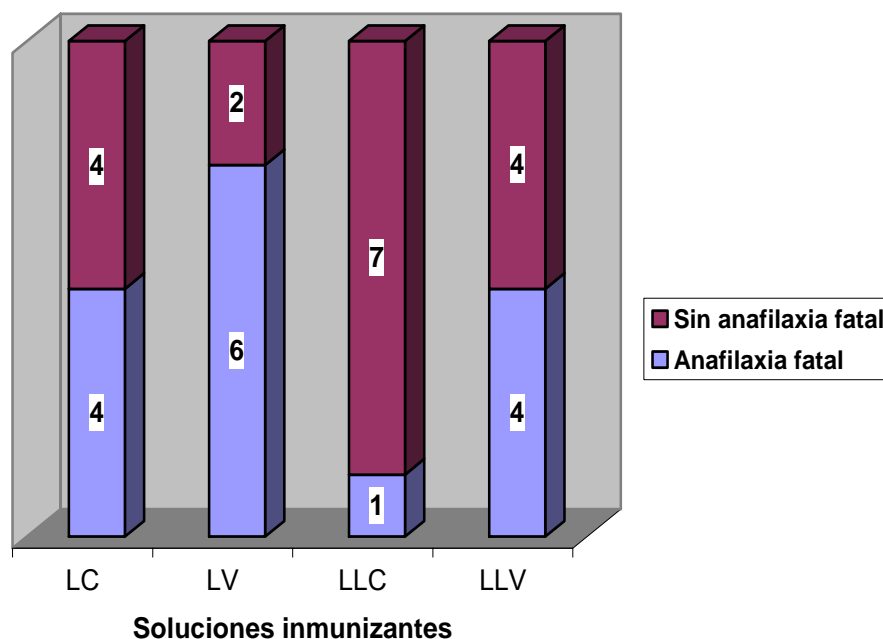
DE = Desviación estándar

Resultados y discusión

Tabla 19.- Volumen en ml de lactosuero de leche de vaca, ingerido diariamente por los cobayas, junto con sus medias por animal y día

Días	Cobayas								Media	DE
	25	26	27	28	29	30	31	32		
1	28,0	36,0	21,0	8,0	76,0	34,0	30,0	42,0	34,4	19,74
2	52,0	98,0	45,0	60,0	75,0	27,0	40,0	50,0	55,9	22,07
3	72,0	93,0	34,0	24,0	97,0	44,0	60,0	44,0	58,5	26,91
4	75,0	45,0	39,0	71,0	86,0	50,0	65,0	44,0	59,4	17,18
5	55,0	98,0	31,0	48,0	98,0	45,0	94,2	32,0	62,6	29,33
6	92,0	97,5	50,0	88,0	97,5	45,0	41,0	79,0	73,8	24,36
7	96,0	98,0	90,0	91,0	124,0	39,0	7,0	59,0	75,5	37,85
8	50,0	95,5	42,0	94,0	123,0	66,0	97,5	56,0	78,0	28,47
9	60,0	98,5	35,0	98,5	124,0	57,0	98,0	28,0	74,9	34,63
10	93,0	99,0	44,0	96,0	124,0	47,0	93,3	59,0	81,9	28,52
11	60,0	124,0	58,0	114,0	123,0	54,0	121,0	85,0	92,4	31,58
12	66,0	146,5	39,0	140,0	148,5	52,0	146,5	68,0	100,8	48,52
13	75,0	165,0	50,0	148,0	174,0	47,0	127,0	92,0	109,6	50,67
14	80,0	171,0	28,0	134,0	174,5	65,0	103,0	91,0	105,8	51,24
15	91,0	160,0	36,0	140,0	172,7	65,0	117,2	30,0	101,5	54,86
Media	69,7	108,3	42,8	90,3	121,1	49,1	82,7	57,3		
DE	19,29	39,44	16,07	42,35	33,97	11,26	40,27	21,69		

DE = Desviación estándar



Gráfica 2.- Número de animales que presentaron anafilaxia fatal en los Ensayos 1 y 3

En los animales sensibilizados frente a LC y LLC hubo un número menor de ellos que presentaron choque anafiláctico, en comparación con los que se habían sensibilizado frente a LV y LLV. En el Ensayo 1, cuatro de los cobayas sensibilizados con LC (grupo II), fueron positivos frente a la reacción de anafilaxia sistémica, comparándolos con los seis, que también resultaron positivos bebiendo LV (grupo IV). En cuanto a los resultados de alergenicidad en los animales sensibilizados frente a lactosueros, Ensayo 3, un solo animal de los sensibilizados frente a LLC (grupo II), presentó anafilaxia fatal, frente a los cuatro que bebieron LLV (grupo IV). Comparando los resultados obtenidos según test de igualdad de porcentajes (Sokal y Rohlf, 1979), se infería que LC respecto a LV ($P=0,15$) y LLC respecto a LLV ($P<0,05$), resultaban hipoalergénicos. Del mismo modo se deducía que LLC frente a LC se mostraba hipoalergénico ($P<0,05$), como también LLV frente a LV ($P=0,15$). Los animales de los grupos controles, no desarrollaron síntomas de anafilaxia sistémica, ni anafilaxia fatal.

El choque anafiláctico es la reacción más severa que puede producirse como consecuencia de una alergia alimentaria. Consiste en un choque sistémico que puede conducir incluso a la muerte, habiéndose implicado en la ingestión diferentes alérgenos alimenticios,

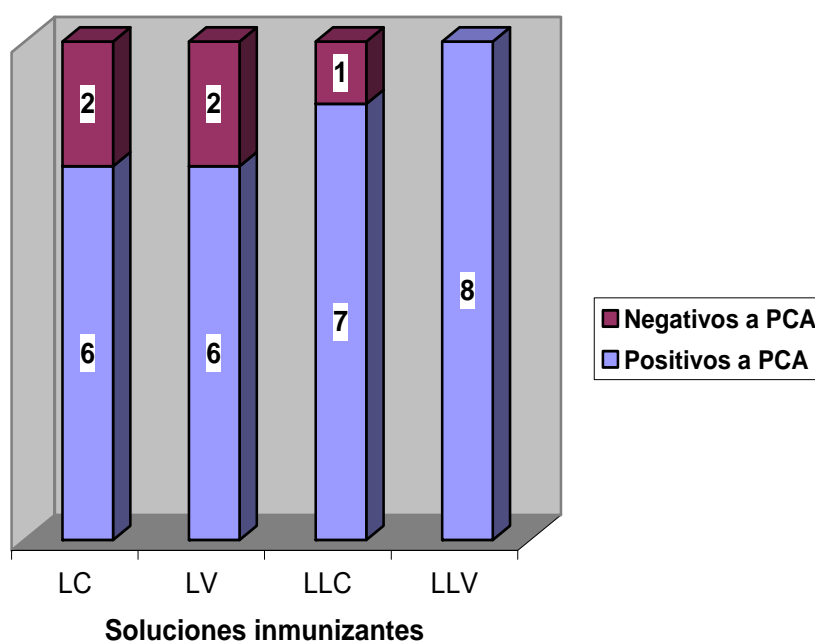
incluida la leche (Park y Haenlein, 2006). Los resultados deducidos por nosotros en relación con la reacción anafiláctica provocada según tipo de leche y lactosuero, no han podido ser comparados con otros más o menos semejantes, por no existir en la bibliografía información al respecto.

Acerca de los motivos por los que la leche de cabra se considera hipoalergénica respecto de la de vaca, se ha sugerido que en la leche de vaca, la α_{S1} -caseína podría actuar como portadora de otros alérgenos, como por ejemplo, la β -lactoglobulina, fracción que se uniría a la α_{S1} -caseína formando un complejo menos digestible. La leche de cabra al tener una menor cantidad de α_{S1} -caseína, daría lugar a una menor cantidad del complejo indicado, facilitándose de este modo, la digestión de la β -lactoglobulina (Bevilacqua y col., 2001). En este sentido, se conoce que el principal factor desencadenante de una alergia alimentaria, es un aumento en la absorción intestinal de antígenos, seguido de una inmuno-reacción local adversa (Walker, 1987). Una exposición prolongada a la leche de vaca en los casos de alergia a sus proteínas, se asocia a una respuesta inflamatoria de la lámina propia de la membrana intestinal, junto a un aumento en la permeabilidad macromolecular (Roberts y col., 1981; Heyman y col., 1988). En cobayas sensibilizados frente a las proteínas de la leche, Heyman y colaboradores (1990), demostraron la existencia de una mayor permeabilidad intestinal, frente a macromoléculas marcadoras. Igualmente, pusieron de manifiesto mediante pruebas *in vitro*, que al estimular con β -lactoglobulina, aumentaba dicha permeabilidad. De acuerdo con esto, resulta difícil admitir la teoría emitida por Bevilacqua y colaboradores (2001). Caso de producirse el complejo α_{S1} -caseína- β -lactoglobulina y resultar ser el responsable de la mayor alergenidad, junto a la respuesta que a nivel intestinal podría originarse, lo que se produciría sería su más fácil absorción, a causa de la alteración que la permeabilidad intestinal, en tales circunstancias sufre.

Independientemente de esto, nosotros hemos deducido una digestibilidad de la proteína de LC, más alta que la de LV, efecto que se identifica debido a su naturaleza.

Prueba de anafilaxia cutánea pasiva para leche de cabra, leche de vaca y para sus lactosueros: Ensayos 2 y 4

Los resultados se indican en la Gráfica 3. Los sueros utilizados en la inyección intradérmica, se obtuvieron mediante inmunización oral de cobayas con LC y LV (Ensayo 2), y con LLC y LLV (Ensayo 4), según lo descrito en Material y métodos. Para LC y LV, el número de animales positivos resultó ser el mismo, seis. Para LLC y LLV, este número fue de siete y ocho, respectivamente. Aplicado el test de igualdad de porcentajes (Sokal y Rohlf, 1979), en ningún caso fue posible detectar diferencias significativas ($P > 0,05$). Sin embargo, los animales del grupo IV, mostraron una reacción más intensa que los del grupo II, como se aprecia en la Figura 5. En todos los animales de los grupos controles (I y III) la prueba de hipersensibilidad fue negativa.



Gráfica 3.- Número de animales que fueron positivos a la prueba de PCA (Ensayos 2 y 4)

Tal como hemos indicado en otros apartados de este capítulo, estos resultados no pueden ser comparados con otros disponibles en la bibliografía, por no existir información similar al respecto. En este sentido, en humanos, Perlman (1977), informa de que un mayor número de pruebas cutáneas positivas, se obtienen frente a determinadas proteínas de la leche de vaca en relación con la de cabra.

Figura 5.- Animales que presentaron reacción positiva a la prueba de PCA



- 1.- Animal control, reacción negativa
- 2.- Reacción de hipersensibilidad a leche de cabra positiva
- 3.- Reacción de hipersensibilidad a leche de vaca positiva

Estudio serológico en los Ensayos 1 y 3: Determinación de IgG (Fc) e IgG1

Las reacciones de tipo I son mediadas por inmunoglobulinas de la clase E, pero su concentración sérica no es abundante, por lo que en ensayos con animales se hace difícil su detección. Hoy se conoce que la subclase IgG1 se une a los receptores Fc de los mastocitos y promueven la desgranulación cuando reacciona con sus antígenos específicos, incrementando los niveles de histamina, (Kawabata y col., 1995; Bevilacqua y col., 2001; Lara-Villoslada y col., 2004). En nuestro caso, para revelar los anticuerpos sistémicos producidos, se utilizó una anti-IgG de cobaya frente a la fracción Fc y una anti-IgG1, marcadas ambas con peroxidasa, constatándose la producción de anticuerpos sistémicos y determinándose su nivel.

Técnica ELISA

Se ha realizado en los sueros procedentes de los cobayas pertenecientes a los Ensayos 1 y 3. Las placas de ELISA se sensibilizaron con el mismo antígeno frente al cual los animales desarrollaron anticuerpos. Los sueros se ensayaron a dobles diluciones, comenzando al 1/4 y siguiendo el protocolo indicado en Material y métodos. El valor límite se determinó para cada animal sobre su sangría 0 como también se indicó en el apartado correspondiente. La Tabla 20 recoge la media de estos valores de los ocho animales que pertenecían a cada grupo.

En todos los sueros se revelaron anticuerpos frente a LC y LV, para el isotipo IgG (Fc). Para la subclase IgG1, seis fueron positivos frente a LC, y ocho frente a LV. En cuanto a los

lactosueros, en todos detectamos anticuerpos para la clase y subclase ensayadas. En las Graficas 4 y 5 están representados los valores medios de DO para las inmunoglobulinas de la clase IgG (Fc) y la subclase IgG1, correspondientes a la sangría realizada a los cobayas al finalizar el ensayo, y antes de inyectarles por vía venosa, la solución antigénica para la realización de la prueba de anafilaxia sistémica. En los sueros de los animales de los grupos controles de cada ensayo, la reacción fue negativa.

Tabla 20.- Media de valores limite determinados por técnica ELISA¹ de las sangrías cero de los distintos animales inmunizados frente a leche de cabra (LC), leche de vaca (LV), lactosuero de leche de cabra (LLC) y lactosuero de leche de vaca (LLV)

	Homóloga	
	IgG (Fc)	IgG1
LC	0,155	0,141
LV	0,142	0,157
LCC	0,0432	0,052
LCV	0,048	0,038

¹Técnica ELISA realizada tapizando la placa con el mismo antígeno que inmunizó a los animales

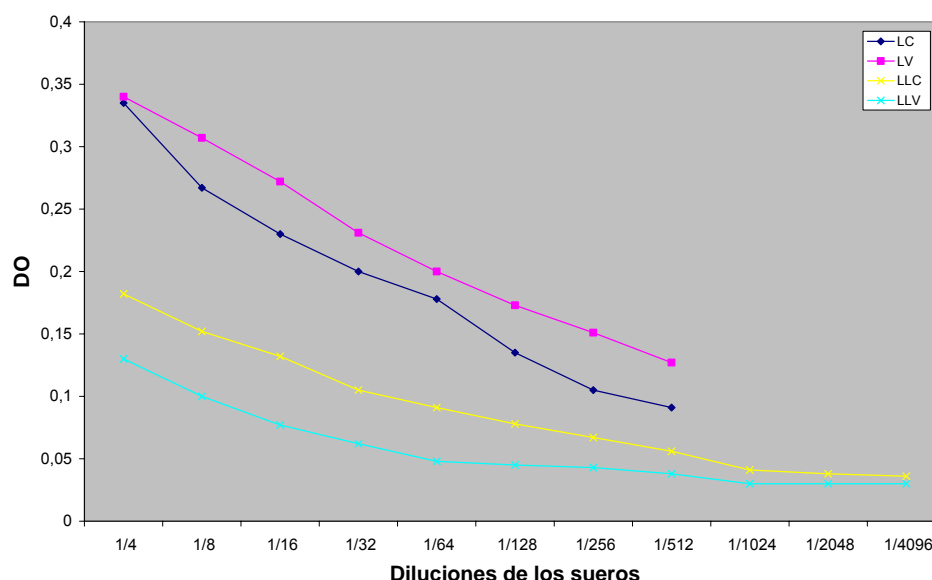
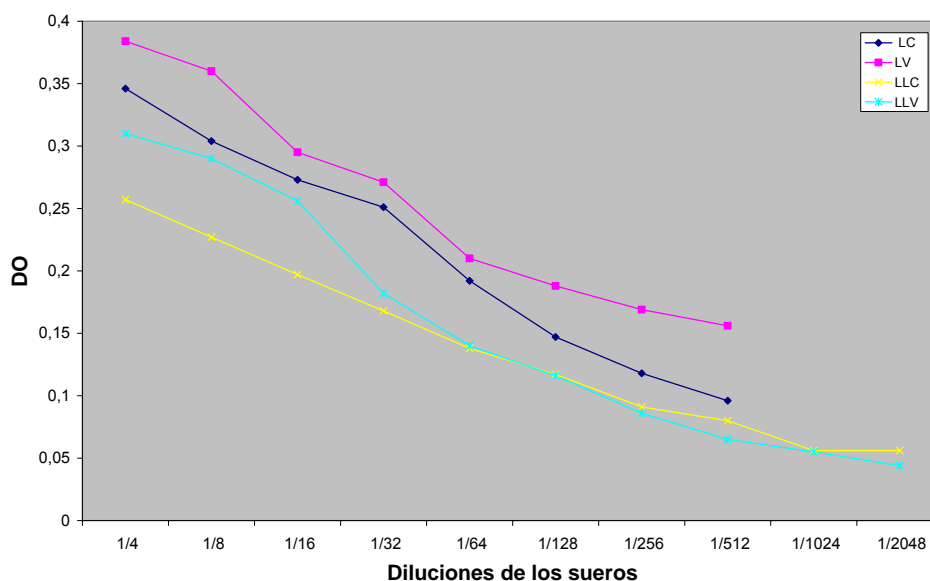


Gráfico 4.- Valores medios de densidad óptica obtenidos en el suero de los animales que se inmunizaron vía oral con leche de cabra (LC), leche de vaca (LV), lactosuero de leche de cabra (LLC) y lactosuero de leche de vaca (LLV), para la clase de inmunoglobulinas IgG (Fc)



Gráfica 5.- Valores medios de densidad óptica obtenidos en el suero de los animales que se inmunizaron vía oral con leche de cabra (LC), leche de vaca (LV), lactosuero de leche de cabra (LLC) y lactosuero de leche de vaca (LLV), para la subclase de inmunoglobulinas IgG1

Respecto de los valores representados en la Gráfica 4, al considerar lo que sucedía en los sueros de los animales sensibilizados frente a LC y LV, se observaba que los valores de DO correspondientes a LV, a todas las diluciones, resultaron superiores a los de LC, ocurriendo lo contrario al comparar LLV frente a LLC. También se deduce de esta grafica, que las DO correspondientes a los sueros procedentes de la inmunización con leche, resultaban superiores a las alcanzadas por los lactosueros. Así mismo, los títulos de los sueros de los animales inmunizados frente a LLC y LLV fueron mayores que los obtenidos para los sensibilizados con LC y LV.

En cuanto a la Gráfica 5, se observaba que a todas las diluciones, los valores de DO correspondientes a los sueros de los animales sensibilizados frente a LV y LLV, fueron superiores a los sensibilizados con LC y LLC. Como en el caso anterior, las DO correspondientes a los sueros procedentes de la inmunización con leche, resultaban superiores a las alcanzadas por los lactosueros. Así mismo, los títulos de los sueros de los animales inmunizados frente a LLC y LLV fueron mayores que los obtenidos para los sensibilizados con LC y LV. Hemos obtenido un mayor nivel de anticuerpos IgG1 para los animales

sensibilizados con LC, estando de acuerdo con los obtenidos por Bevilacqua y colaboradores (2001) y Lara-Villoslada y colaboradores (2004).

Se ha realizado un análisis estadístico (análisis de la varianza) con los valores de DO de los sueros a la dilución 1/64, recogiendo en las Tablas 21 y 22, los resultados correspondientes al Ensayo 1 y en las Tablas 23 y 24, los del Ensayo 3. Con este fin y dado que las ingestas de leche no resultaron diferentes entre grupos, dichas ingestas se utilizaron como factor de covarianza al comparar los resultados obtenidos entre grupos.

Tabla 21.- Valores de densidad óptica en sueros a la dilución 1/64 determinados por ELISA, para IgG (Fc) e IgG1, frente a leche de cabra (LC) y leche de vaca (LV). Ensayo 1. Diferencias entre grupos para cada una de ellas

	Grupo II ¹	Grupo IV ²	DER	Nivel de significación
Homóloga ³ IgG(Fc)	0,167	0,211	0,074	NS
Homóloga ³ IgG1	0,188	0,214	0,095	NS

¹Sueros del grupo de animales que se inmunizaron frente a LC, vía oral

²Sueros del grupo de animales que se inmunizaron con LV, vía oral

³Placas ELISA sensibilizadas con el mismo antígeno, frente al cual los animales desarrollaron los anticuerpos

DER: Desviación estándar residual; NS: No significativo

No se detectaban diferencias significativas ($P > 0,05$) ni para IgG (Fc) ni para IgG1. Sin embargo, en el caso de los valores de IgG (Fc), la diferencia entre grupos se establecía a un nivel de $P = 0,20$ indicativo, de que el valor correspondiente al grupo IV resultaba mayor que el del II al nivel indicado (Tabla 21).

Tabla 22.- Valores de densidad óptica en sueros a la dilución 1/64 determinados por ELISA para IgG (Fc) e IgG1, frente a leche de cabra (LC) y leche de vaca (LV). Ensayo 1. Diferencias entre las dos inmunoglobulinas dentro de cada grupo

	Homóloga ¹		DER	Nivel de significación
	IgG (Fc)	IgG1		
Grupo II ²	0,178	0,192	0,097	NS
Grupo IV ³	0,200	0,210	0,070	NS

¹Placas ELISA sensibilizadas con el mismo antígeno, frente al cual los animales desarrollaron los anticuerpos

²Sueros del grupo de animales que se inmunizaron frente a LC, vía oral

³Sueros del grupo de animales que se inmunizaron con LV, vía oral

DER: Desviación estándar residual; NS: No significativo

Dentro de cada grupo, la diferencia entre los valores correspondientes a IgG (Fc) e IgG1, no resultaba en ningún caso, estadísticamente diferente ($P > 0,05$), aunque los valores correspondientes a la subclase IgG1 resultaban algo más altos (Tabla 22).

En el Ensayo 3, que consistió en la sensibilización oral con LLC y LLV, el tratamiento estadístico se realizó a la dilución 1/64 (Tablas 23 y 24).

Tabla 23.- Valores de densidad óptica en sueros a la dilución 1/64 determinados por ELISA para IgG (Fc) e IgG1, frente a lactosuero de leche de cabra (LLC) y lactosuero de leche de vaca (LLV). Ensayo 3. Diferencias entre grupos para cada una de ellas

	Grupo II ¹	Grupo IV ²	DER	Nivel de significación
Homóloga ³ IgG (Fc)	0,105	0,062	0,037	*
Homóloga ³ IgG1	0,168	0,182	0,074	NS

¹Grupo de animales que se inmunizaron frente a LLC, vía oral

²Grupo de animales que se inmunizaron frente a LLV, vía oral

³Placas ELISA sensibilizadas con el mismo antígeno frente al cual los animales desarrollaron los anticuerpos

DER: Desviación estándar residual; NS: No significativo; * $P < 0,05$

Analizadas para cada isotipo las diferencias existentes entre grupos, se detectaba en el caso de los valores de IgG (Fc), una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$),

deduciéndose en consecuencia, mayor el valor correspondiente al grupo II. Por el contrario, para IgG1, los valores entre grupos no se detectaban estadísticamente diferentes ($P > 0,05$) (Tabla 23).

Tabla 24.- Valores de densidad óptica determinados en sueros a la dilución 1/64 por ELISA para IgG (Fc) e IgG1, frente a lactosuero de leche de cabra (LLC) y lactosuero de leche de vaca (LLV). Ensayo 3. Diferencias entre las dos inmunoglobulinas dentro de cada grupo

	Homóloga ¹		DER	Nivel de significación
	IgG (Fc)	IgG1		
Grupo II ²	0,105	0,168	0,043	**
Grupo IV ³	0,062	0,182	0,069	**

¹Placas de ELISA

²Grupo de animales que se inmunizaron frente a LLC, vía oral

³Grupo de animales que se inmunizaron frente a LLV, vía oral

DER: Desviación estándar residual; ** $P < 0,01$

Dentro de cada grupo, la diferencia entre los valores de IgG (Fc) e IgG1, se detectaba estadísticamente diferente ($P < 0,05$), resultando en consecuencia, mayores para ambos grupos, los valores correspondientes a IgG1 (Tabla 24), lo que resulta lógico, ya que las inmunoglobulinas IgG1 son las que están involucradas en la reacción de hipersensibilidad de tipo I.

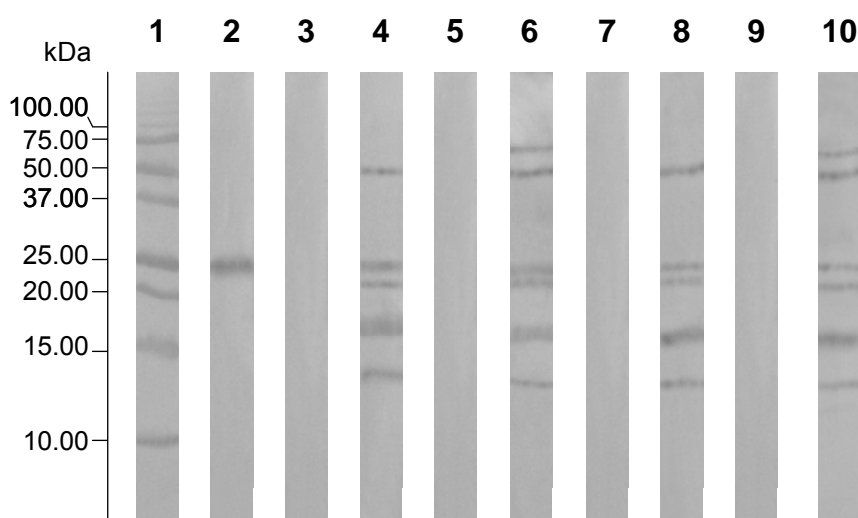
Los resultados obtenidos respecto de los niveles séricos de IgG1, para los animales sensibilizados con LC y LV, coinciden con los deducidos por Lara-Villoslada y colaboradores (2004), autores que utilizaron ratones sensibilizados mediante sonda gástrica con leche UHT de cabra o vaca desnatada, empleando como adyuvante toxina colérica. De acuerdo con la DO correspondiente, los niveles plasmáticos de IgG1 a la dilución 1/10, resultaban mayores bajo consumo de leche de vaca.

Lo deducido cuando los animales se sensibilizaban con los lactosueros de los dos tipos de leche, así como, lo que se infería al comparar los niveles de los dos isotipos analizados, no pueden ser discutidos, con otra información disponible que resulte más o menos similar, por ser nula la existente al respecto.

Técnica de Western blot

Las Figuras 6 y 7 muestran los polipéptidos reconocidos por los sueros de los cobayas inmunizados por vía oral (Ensayo 1) grupos II y IV. Se revelaron la presencia de inmunoglobulinas de la clase IgG (Fc) y subclase IgG1. La primera figura muestra las moléculas antigénicas de LC reconocidas por los anticuerpos desarrollados en los animales sensibilizados frente a dicho antígeno.

Figura 6.- Polipéptidos antigénicos revelados por los sueros de los cobayas sensibilizados por vía oral frente a leche de cabra (LC)

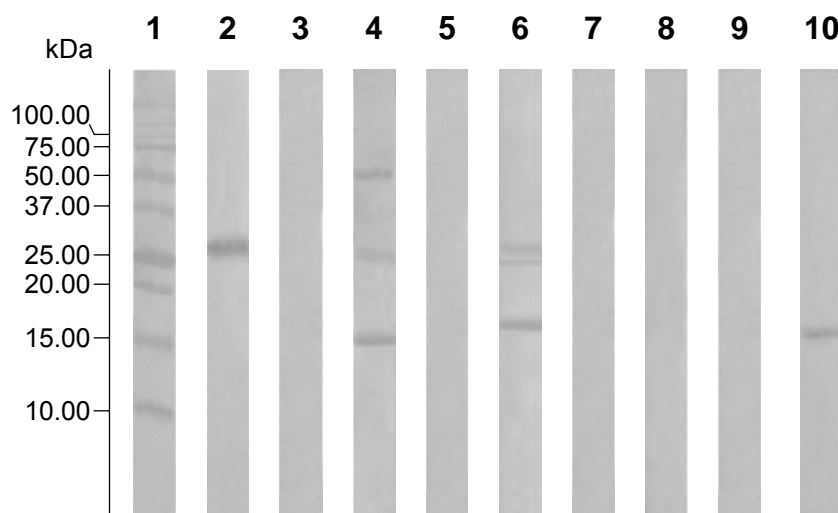


Carril 1: Marcadores de pesos moleculares; carril 2: Marcador de β -caseína de cabra; carriles 3 y 5: Sangría cero animal 9, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente; carriles 4 y 6: Sangría final del animal 9, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente; carriles 7 y 9: Sangría cero animal 13, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente; carriles 8 y 10: Sangría final del animal 13, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente

En general, los anticuerpos estuvieron dirigidos frente a las mismas moléculas que las reveladas por los inmuniseros de conejo, a excepción de lo correspondiente a las de altos pesos moleculares, detectándose dos bandas cuando se empleaba como anticuerpo secundario anti-IgG 1 y, una para el caso de IgG (Fc).

En la figura 7 se muestra el patrón de las moléculas antigénicas de LV frente a las cuales se formaban los anticuerpos en los animales sensibilizados frente este mismo antígeno.

Figura 7.- Polipéptidos antigénicos revelados por los sueros de los cobayas sensibilizados por vía oral frente a leche de vaca (LV)



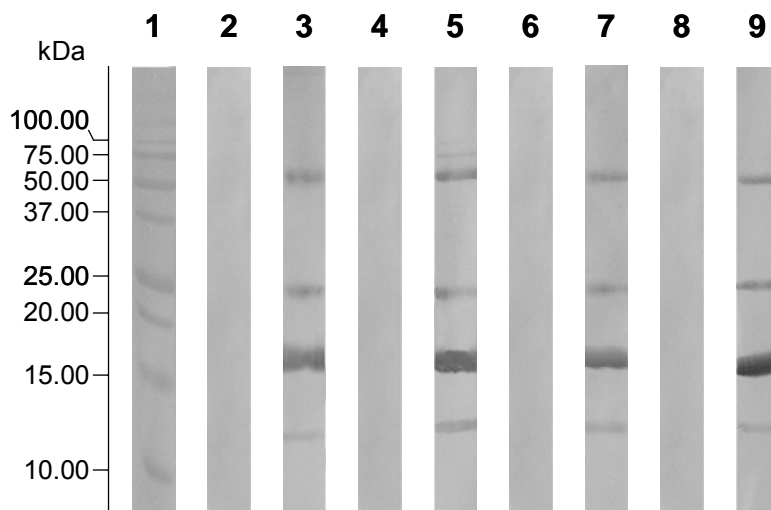
Carril 1: Marcadores de pesos moleculares; carril 2: Marcador de β -caseína de cabra; carriles 3 y 5: Sangría cero animal 27, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente; carriles 4 y 6: Sangría final del animal 27, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente; carriles 7 y 9: Sangría cero animal 31, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente; carriles 8 y 10: Sangría final del animal 31, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente

En el caso de los animales sensibilizados con LV, las proteínas que se revelaban correspondían a β -lactoglobulina, complejo caseína y, en algunos casos, a cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. La banda correspondiente a la α -lactoalbúmina se reconoció muy débil o no fue reconocida. El animal 31, para la clase IgG (Fc) fue negativo, no siéndolo para IgG1, aunque por ELISA resultaba negativo frente a esta última subclase, resultado éste debido a que la técnica ELISA es menos sensible que el inmunobloting. Además este animal sufrió choque anafiláctico, lo que demuestra que se habían formado anticuerpos frente a las proteínas de LV.

Hemos revelado un polipéptido en la zona de las caseínas, resultado que está de acuerdo con los obtenidos por otros autores empleando sueros humanos (Umpiérrez y col., 1999; Álvarez y Lombardero, 2002; Muñoz Martín y col., 2004). Por el contrario, Bevilacqua y colaboradores (2001) con ELISA, utilizando diferentes fracciones de la leche y en sueros de animales sensibilizados por vía oral, sostienen que los anticuerpos formados están dirigidos más bien frente a β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina.

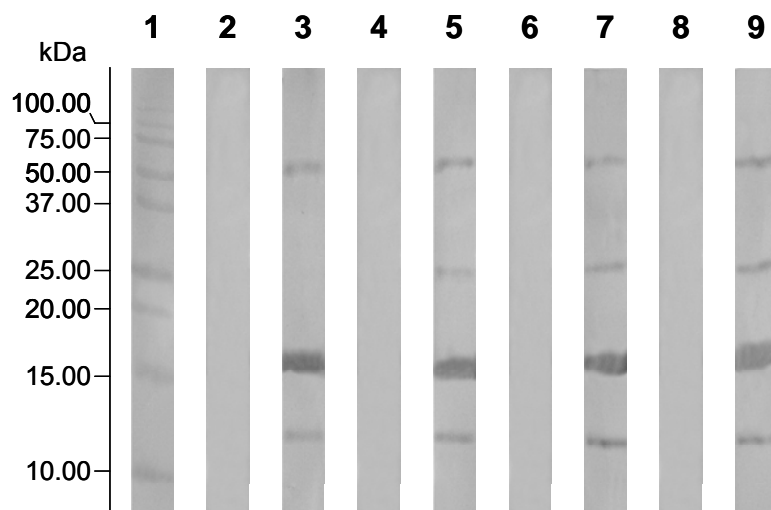
Las Figuras 8 y 9 muestran los polipéptidos reconocidos por los sueros de los cobayas inmunizados por vía oral frente a LLC y LLV respectivamente (grupos II y IV del Ensayo 3). Se revelaba la presencia de inmunoglobulinas de la clase IgG (Fc) y subclase IgG1.

Figura 8.- Polipéptidos antigénicos revelados por los sueros de los cobayas sensibilizados por vía oral frente a lactosuero de leche de cabra (LLC)



Carril 1: Marcadores de pesos moleculares; carriles 2 y 4: Sangría cero animal 15, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente; carriles 3 y 5: Sangría final del animal 15, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente; carriles 6 y 8: Sangría cero animal 16, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente; carriles 7 y 9: Sangría final del animal 16, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente

Figura 9.- Polipéptidos antigénicos revelados por los sueros de los cobayas sensibilizados frente a lactosuero de leche de vaca (LLV)



Carril 1: Marcadores de pesos moleculares; carriles 2 y 4: Sangría cero animal 25, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente; carriles 3 y 5: Sangría final del animal 25, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente; carriles 6 y 8: Sangría cero animal 27, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente; carriles 7 y 9: Sangría final del animal 27, anticuerpo secundario IgG (Fc) e IgG1 respectivamente

Los animales sensibilizados por vía oral frente a LLC y LLV, mostraron anticuerpos dirigidos frente a cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, frente a β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina. La particularidad de estas Figuras 8 y 9 con respecto a las 6 y 7, es la ausencia de la banda correspondiente al complejo caseína, lo que se explica debido a que en los lactosueros no estaban presentes estas proteínas y por tanto, a partir de los sueros inmunes obtenidos, no se producían anticuerpos frente a ellas. Las bandas correspondientes a β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, resultaban más intensas en las imágenes de las Figuras 8 y 9 que en las de las 6 y 7, debido a que en el volumen de muestra dispensado, 3 μ l, la cantidad de proteínas séricas sometida, en cada caso, a electroforesis, 6 μ g, era mayor dada la no existencia de caseínas.

4.2.3.- Determinación de la reactividad cruzada entre las proteínas de leche de cabra, leche de vaca y de sus lactosueros: Ensayos *in vitro*

Ensayos realizados en sueros inmunes de conejos

Técnica ELISA

Utilizamos los sueros inmunes de conejo obtenidos frente a LC, LV, LLC y LLV. Con la técnica ELISA y en su sangría de sacrificio, se determinó su grado de reactividad cruzada, empleando la dilución 1/4096. En la Tabla 25 se presentan los valores de DO obtenidos frente al antígeno que se utilizó en su inmunización y, frente a las restantes soluciones inmunizantes, (el valor de DO corresponde a la media de tres réplicas). También se muestran los valores límite de DO determinados sobre las sangrías cero, igualmente con su antígeno específico y con los restantes antígenos.

En todos los casos, los valores de DO homólogos resultaron superiores a los heterólogos. También es digno de destacar la existencia de reactividad cruzada entre cada inmunisero obtenido y las cuatro soluciones antigénicas empleadas.

Resultados y discusión

Tabla 25.- Valores de densidad óptica homólogos y de reactividad cruzada de los inmuniseros de conejo obtenidos por ELISA en la sangría de sacrificio a la dilución 1/4096 y de sus correspondientes valores límites (media $S_0 + 3 \times DE$)

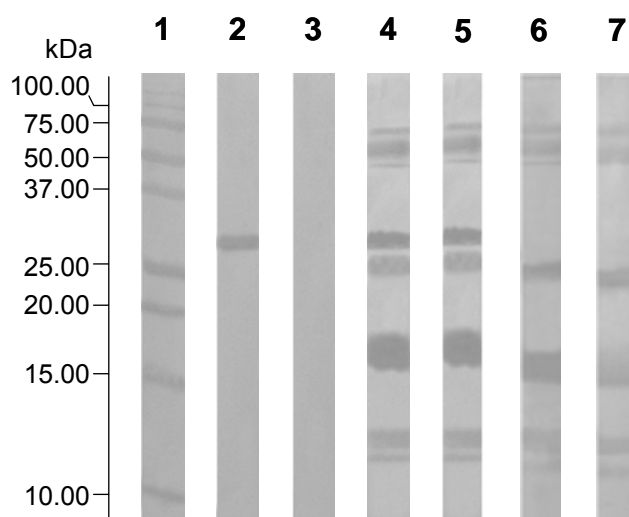
Sangría de sacrificio	Antígenos				Valores límites de los sueros preinmunes			
	LC ⁵	LV ⁶	LLC ⁷	LLV ⁸	S ₀ ⁹	S ₀ ¹⁰	S ₀ ¹¹	S ₀ ¹²
Ac-LC ¹	0,252*	0,156	0,234	0,164	0,0658	0,0566	0,0648	0,0561
Ac-LV ²	0,209	0,347*	0,340	0,296	0,0983	0,0928	0,0742	0,0628
Ac-LLC ³	0,223	0,163	0,383*	0,225	0,1786	0,092	0,0863	0,0679
Ac-LLV ⁴	0,085	0,137	0,140	0,146*	0,0752	0,0717	0,0913	0,0705

*Reacción homóloga; ¹Ac-LC: Anticuerpos frente a leche de cabra; ²Ac-LV: Anticuerpos frente a leche de vaca; ³Ac-LLC: Anticuerpos frente a lactosuero de cabra; ⁴Ac-LLV: Anticuerpos frente a lactosuero de vaca; ⁵LC = Leche de cabra; ⁶LV = Leche de vaca; ⁷LLC = Lactosuero de cabra; ⁸LLV = lactosuero de vaca; ⁹S₀ = Valor límite frente al antígeno LC para las distintas sangrías de sacrificio; ¹⁰S₀ = Valor límite frente al antígeno LV para las distintas sangrías de sacrificio; ¹¹S₀ = Valor límite frente al antígeno LLC para las distintas sangrías de sacrificio; ¹²S₀ = Valor límite frente al antígeno LLV para las distintas sangrías de sacrificio

Técnica de Western blot

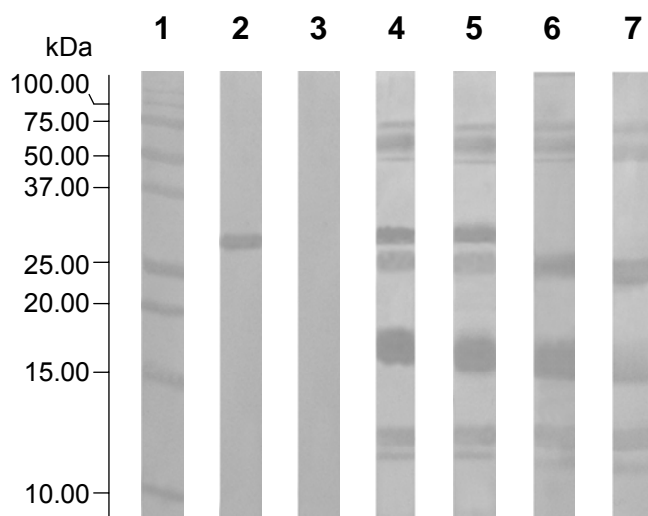
En esta técnica los sueros inmunes se utilizaron al 1/50, siguiéndose la pauta indicada en Material y métodos. En las Figuras 10 y 11, se muestran los patrones antigénicos reconocidos por la sangría de sacrificio de los conejos frente a LC y LV respectivamente, ensayada con las distintas soluciones antigénicas, salvo en el carril 3, en el que se utilizaba la sangría 0 frente al antígeno homólogo correspondiente.

Figura 10.- Polipéptidos antigénicos revelados por el suero del conejo inmunizado con leche de cabra (LC), reacción homóloga, y las de reactividad cruzada, con las soluciones antigénicas heterólogas: leche de vaca (LV), lactosuero de leche de cabra (LLC) y lactosuero de leche de vaca (LLV)



Carril 1: marcadores de pesos moleculares; carril 2: marcador de β -caseína de cabra; carriles 3 y 4: se ha transferido LC; carril 5: LV; carril 6: LLC y carril 7: LLV

Figura 11.- Polipéptidos antigénicos revelados por el suero del conejo inmunizado con leche de vaca (LV), reacción homóloga, y las de reactividad cruzada, con las soluciones antigénicas heterólogas: leche de cabra (LC), lactosuero de leche de vaca (LLV) y lactosuero de leche de cabra (LLC)

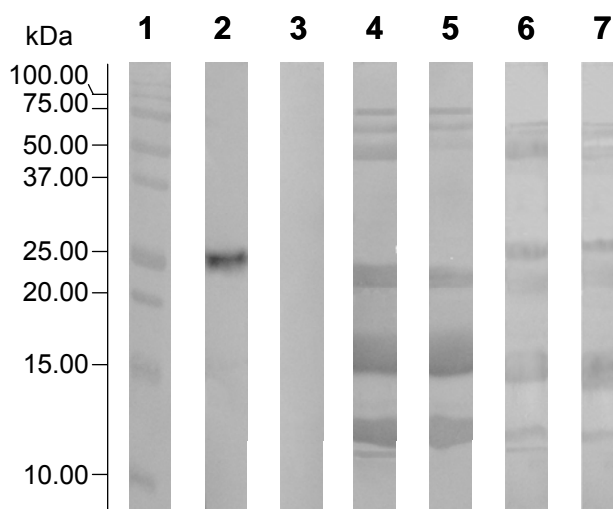


Carril 1: marcadores de pesos moleculares; carril 2: marcador de β -caseína de cabra; carriles 3 y 4: se ha transferido LV; carril 5: LC; carril 6: LLV y carril 7: LLC

En LC y LV, los dos inmuniseros revelaron los mismos polipéptidos, tanto en las reacciones homólogas como en las heterólogas: Tres bandas de altos pesos moleculares correspondientes a lactoferrina, seroalbúmina y cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, seguidas de las correspondientes al complejo caseína, otra a las cadenas ligeras y por último, las de bajos pesos moleculares de la β -lactoglobulina y de las dos isoformas de α -lactoalbúmina. En cuanto a LLC y LLV, los dos inmuniseros reconocieron el mismo patrón, a excepción de la banda correspondiente al complejo caseína, debido a la ausencia de caseinatos en los lactosueros.

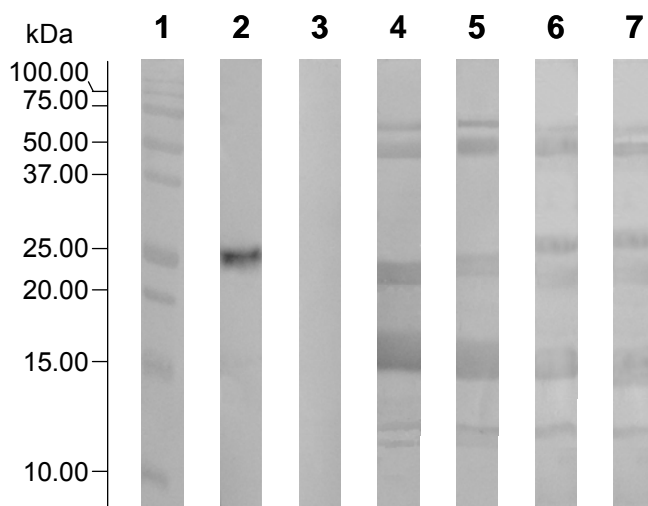
En las Figuras 12 y 13, se muestran los patrones antigénicos reconocidos por la sangría de sacrificio de los conejos frente a LLC, y LLV respectivamente, probadas con las distintas soluciones antigénicas, salvo en el carril 3 en el que se utilizaba la sangría 0 frente al antígeno homólogo correspondiente.

Figura 12.- Polipéptidos antigénicos revelados por el suero del conejo inmunizado con lactosuero de leche de cabra (LLC), reacción homóloga, y las de reactividad cruzada, con las soluciones antigénicas heterólogas: lactosuero de leche de vaca (LLV), leche de cabra (LC) y leche de vaca (LV)



Carril 1: marcadores de pesos moleculares; carril 2: marcador de β -caseína de cabra ; carriles 3 y 4: se ha transferido LLC; carril 5: LLV; carril 6: LC y carril 7: LV

Figura 13.- Polipéptidos antigénicos revelados por el suero del conejo inmunizado con lactosuero de leche de vaca (LLV), reacción homóloga, y las de reactividad cruzada, con las soluciones antigénicas heterólogas: lactosuero de leche de cabra (LLC), leche de vaca (LV) y leche de cabra (LC)



Carril 1: marcadores de pesos moleculares; carril 2: marcador de β -caseína de cabra ; carriles 3 y 4: se ha transferido LLV; carril 5: LLC; carril 6: LV y carril 7: LC

Los dos inmuniseros de conejo producidos frente a LLC y LLV, revelaron los mismos polipéptidos que al emplear los obtenidos para los dos tipos de leche. Frente a los antígenos

LC y LV, reconocían la banda de las caseínas, demostrando que los anticuerpos desarrollados frente a las moléculas específicas del lactosuero, comparten epítomos comunes con las caseínas responsables de la reactividad cruzada.

Ensayos realizados en sueros de cobayas inmunizados por vía oral

Técnica ELISA

Los sueros ensayados correspondían a los animales de los Ensayos 1 y 3. Las placas ELISA, se sensibilizaron con distinto antígeno frente al cual se habían desarrollado los anticuerpos (reacción heteróloga), siguiendo el protocolo indicado en Material y métodos. Para los dos isotipos, cuando empleábamos sueros de animales anti-LC frente a proteínas de LV, el número de animales positivos fue de seis. Con el suero de animales anti-LV y proteínas LC, obtuvimos siete positivos, también para los dos isotipos. No ocurrió lo mismo con los lactosueros, apareciendo menor número de positivos. Para el inmunisero frente a LLC se obtuvieron cuatro positivos de IgG (Fc) y cinco de IgG1. En el caso del inmunisero LLV, los resultados fueron cinco y seis para IgG (Fc) e IgG1, respectivamente. De esto se deduce, la existencia de una fuerte reactividad cruzada, tanto para los dos tipos de leche como para los de lactosuero. Al mismo tiempo, los resultados obtenidos parecen indicar que esta reactividad se manifiesta algo más, con el inmunisero anti-LV y anti-LLV. La diferencia entre el comportamiento de los dos tipos de leche y lactosueros, se debería a la no existencia de caseínas en estos últimos (Restani y col., 1999, 2002).

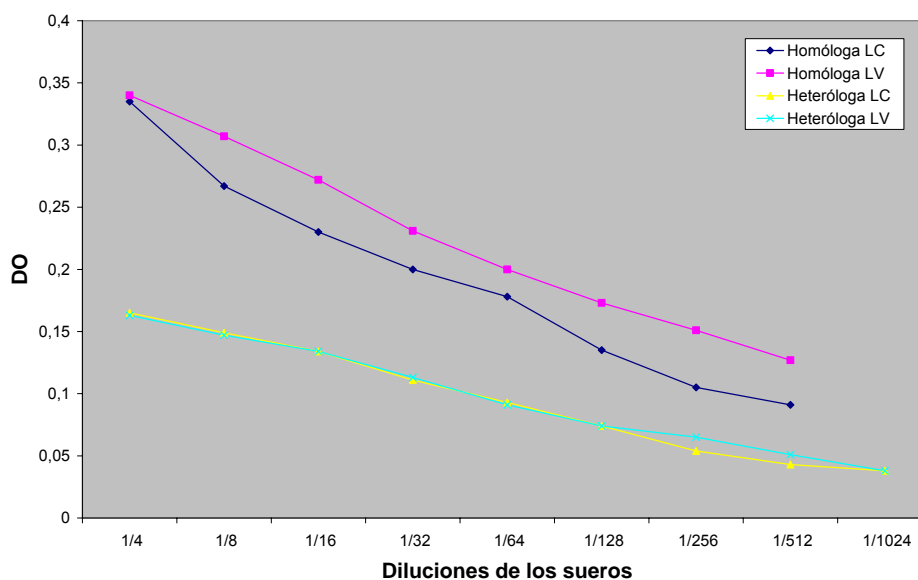
En las Gráficas 6 y 7, se representan los valores medios de DO a las distintas diluciones de los sueros de los animales inmunizados frente a LC y LV, tanto frente a su antígeno específico (reacción homóloga) como al que no se inmunizó (reacción heteróloga), revelando la IgG (Fc) y la IgG1. De igual forma, en las Gráficas 8 y 9, indicamos para la reacción homóloga y heteróloga, los valores medios de DO para los sueros de los animales inmunizados frente a LLC y LLV. Antes de proceder a la inmunización oral, se les extrajo sangre a los cobayas (sangría cero). El valor límite se determinó para cada grupo, calculando la media del valor límite correspondiente a los ocho animales, tal como se indicaba en

Material y métodos. La Tabla 26 recoge la media de estos valores heterólogos, para los dos tipos de leche y de igual forma, para sus respectivos lactosueros.

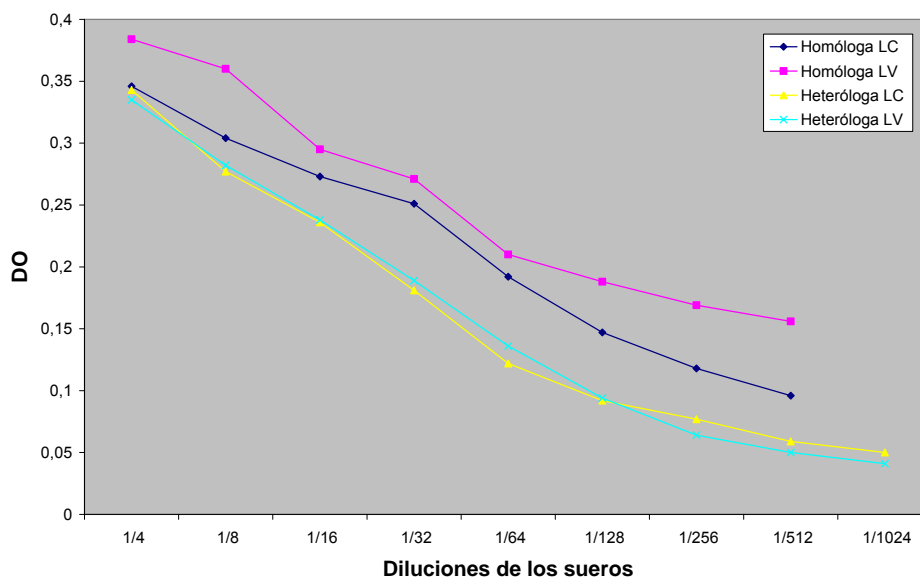
Tabla 26.- Media de valores límite de las sangrías cero de los cobayas, previas a la inmunización por vía oral frente a leche de cabra (LC), leche de vaca (LV), lactosuero de leche de cabra (LLC) y lactosuero de leche de vaca (LLV)

Soluciones antigénicas	Heteróloga ¹	
	IgG (Fc)	IgG1
LC	0,040	0,041
LV	0,056	0,074
LLC	0,034	0,039
LLV	0,050	0,042

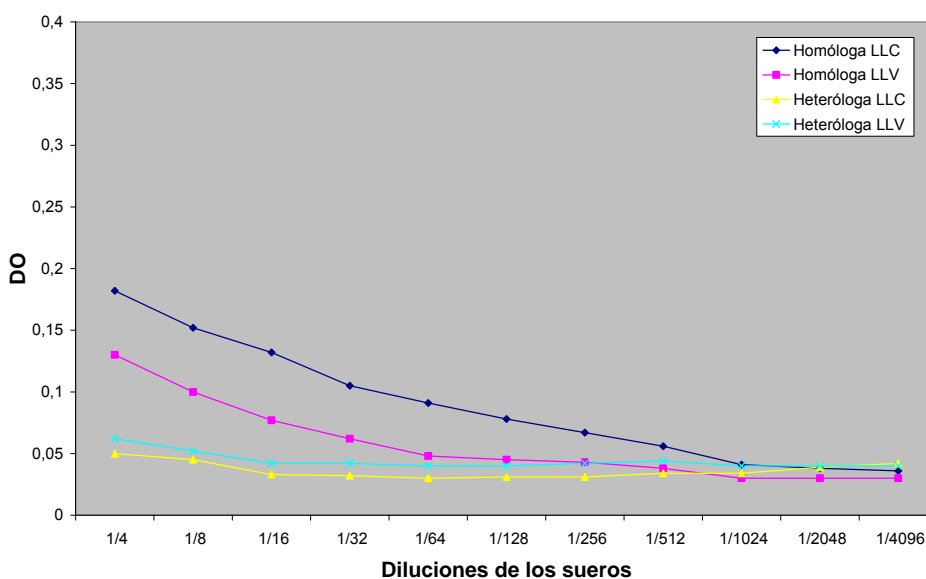
¹Técnica ELISA realizada tapizando la placa con diferente antígeno (el otro tipo de leche o de lactosuero) frente al cual fueron inmunizados los animales



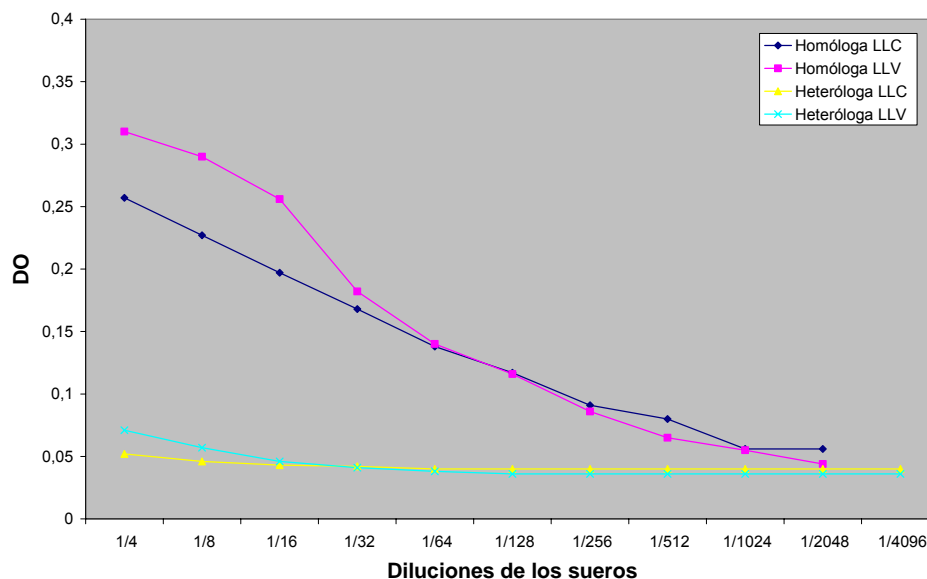
Gráfica 6.- Valores medios de densidad óptica obtenidos en el suero de los animales que se inmunizaron vía oral con leche de cabra y leche de vaca, para la clase de inmunoglobulina IgG (Fc)



Gráfica 7.- Valores medios de densidad óptica obtenidos en el suero de los animales que se inmunizaron vía oral con leche de cabra y leche de vaca, para la clase de inmunoglobulina IgG1



Gráfica 8.- Valores medios de densidad óptica obtenidos en el suero de los animales que se inmunizaron vía oral con lactosuero de leche de cabra y lactosuero de leche de vaca, para la clase de inmunoglobulinas IgG (Fc)



Gráfica 9.- Valores medios de densidad óptica obtenidos en el suero de los animales que se inmunizaron vía oral con lactosuero de leche de cabra y lactosuero de leche de vaca, para la clase de inmunoglobulinas IgG1

Con respecto a estas gráficas, conviene destacar que los valores correspondientes a las reacciones heterólogas resultan muy semejantes en los cuatro casos considerados. Al mismo tiempo, se aprecia que los valores de las reacciones homólogas, resultan de manera lógica, superiores a los de sus correspondientes heterólogas. Igualmente se observa, que los títulos alcanzados para cada una de las reacciones heterólogas, son algo superiores a los de sus correspondientes homólogas.

Se ha realizado un análisis estadístico (análisis de la varianza) con los valores de DO de los sueros a la dilución 1/64, recogiendo en las Tablas 27 y 28, los resultados correspondientes al Ensayo 1, y en las Tablas 29 y 30, los del Ensayo 3.

Tabla 27.- Valores de densidad óptica en sueros a la dilución 1/64 determinados por ELISA, para IgG (Fc) e IgG1, frente a leche de cabra (LC) y leche de vaca (LV). Ensayo1. Diferencias entre grupos para un mismo isotipo

	Grupo II ¹	Grupo IV ²	DER	Nivel de significación
Heteróloga ³ IgG (Fc)	0,092	0,092	0,050	NS
Heteróloga ³ IgG1	0,133	0,125	0,085	NS

¹Sueros del grupo de animales que se inmunizaron frente a LC, vía oral

²Sueros del grupo de animales que se inmunizaron con LV, vía oral

³Placas ELISA sensibilizadas con distinto antígeno, frente al cual los animales desarrollaron los anticuerpos

DER: Desviación estándar residual; NS: No significativo

Como ya habíamos indicado y dado que las ingestas de leche no resultaron diferentes entre grupos, los valores individuales de las mismas, se emplearon como factor de covarianza, a la hora de analizar los datos de DO aquí considerados. Para cada isotipo, analizados los valores entre grupos, no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) (Tabla 27).

Tabla 28.- Valores de densidad óptica en sueros a la dilución 1/64 determinados por ELISA para IgG (Fc) e IgG1, frente a leche de cabra (LC) y leche de vaca (LV). Ensayo 1. Diferencias entre isotipos para un mismo grupo

	Heteróloga ¹		DER	Nivel de significación
	IgG (Fc)	IgG1		
Grupo II ²	0,093	0,136	0,080	NS
Grupo IV ³	0,200	0,122	0,075	*

¹Placas ELISA sensibilizadas con distinto antígeno, frente al cual los animales desarrollaron los anticuerpos

²Sueros del grupo de animales que se inmunizaron frente a LC, vía oral

³Sueros del grupo de animales que se inmunizaron con LV, vía oral

DER: Desviación estándar residual; NS: No significativo; * $P < 0,05$

Dentro del grupo II, las diferencias entre isotipos resultaron estadísticamente no diferentes ($P > 0,05$). Por el contrario, para el grupo IV, el valor medio correspondiente a IgG (Fc), se detectaba estadísticamente mayor ($P < 0,05$) que el correspondiente a IgG1 (Tabla 28).

Tabla 29.- Valores de densidad óptica en sueros a la dilución 1/64 determinados por ELISA, para IgG (Fc) e IgG1, frente a lactosuero de leche de cabra (LLC) y lactosuero de leche de vaca (LLV). Ensayo 3. Diferencias entre grupos para un mismo isotipo

	Grupo II ¹	Grupo IV ²	DER	Nivel de significación
Heteróloga ³ IgG (Fc)	0,032	0,042	0,006	**
Heteróloga ³ IgG1	0,041	0,042	0,009	NS

¹Sueros del grupo de animales que se inmunizaron frente a LLC, vía oral

²Sueros del grupo de animales que se inmunizaron con LLV, vía oral

³Placas ELISA sensibilizadas con distinto antígeno, frente al cual los animales desarrollaron los anticuerpos

DER: Desviación estándar residual; NS: No significativo; **P<0,01

Analizadas las diferencias existentes entre grupos, para cada isotipo, se detectaba en el caso de los valores de IgG (Fc), una diferencia estadísticamente significativa (P<0,05), deduciéndose en consecuencia un valor medio mayor para el grupo IV. Por el contrario, para IgG1, los valores entre grupos no se detectaban estadísticamente diferentes (P>0,05) (Tabla 29).

Tabla 30.- Valores de densidad óptica en sueros a la dilución 1/64 determinados por ELISA para IgG (Fc) e IgG1, frente a lactosuero de leche de cabra (LLC) y lactosuero de leche de vaca (LLV). Ensayo 3. Diferencias entre isotipos para un mismo grupo

	Heteróloga ¹		DER	Nivel de significación
	IgG (Fc)	IgG1		
Grupo II ²	0,032	0,041	0,003	**
Grupo IV ³	0,042	0,042	0,010	NS

¹Placas ELISA sensibilizadas con distinto antígeno, frente al cual los animales desarrollaron los anticuerpos

²Sueros del grupo de animales que se inmunizaron frente a LLC, vía oral

³Sueros del grupo de animales que se inmunizaron con LLV, vía oral

DER: Desviación estándar residual; NS: No significativo; **P<0,01

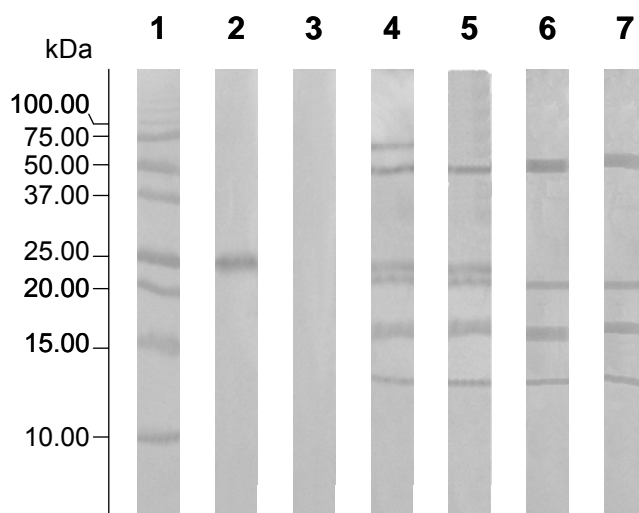
Analizados para cada grupo, los valores correspondientes a los dos isotipos, se reflejaba dentro del grupo II, una diferencia significativa (P<0,05), deduciéndose en consecuencia un

valor medio mayor para IgG1. Por el contrario, dentro del grupo IV, la diferencia entre isotipos no se detectaba estadísticamente diferente ($P>0,05$), ya que los valores resultaban idénticos (Tabla 30).

Técnica de Western blot

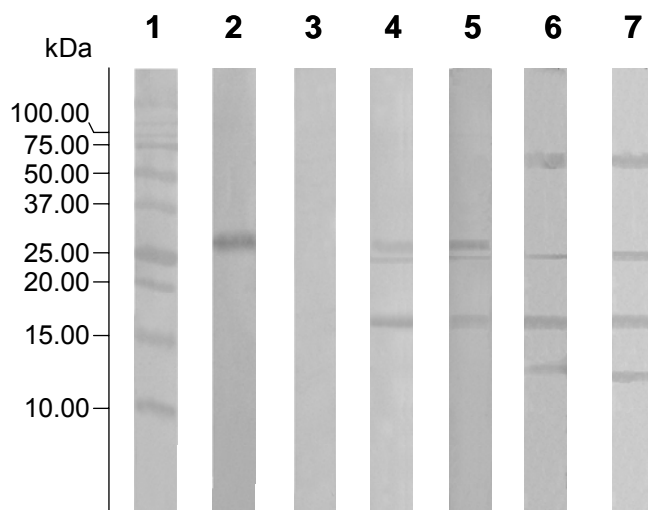
El análisis de los polipéptidos antigénicos de reactividad cruzada, que son reconocidos se llevó a cabo en los sueros de los cobayas inmunizados por vía oral, y los resultados se muestran en las figuras 14, 15, 16 y 17. El patrón antigénico polipeptídico reconocido por los dos anticuerpos secundarios en los ensayos de reactividad homóloga, ha sido el mismo, dado que la subclase IgG1, interviene en la desgranulación de la membrana de los mastocitos y produce una serie de mediadores responsables de la reacción de hipersensibilidad inmediata de tipo I (Ritz y col., 1993). En estos ensayos empleamos como anticuerpo secundario, sólo la anti-IgG1 de cobaya marcada con peroxidasa. En las Figuras 14 y 15, se muestran los polipéptidos antigénicos de reactividad cruzada, reconocidos por los sueros obtenidos en la sangría de sacrificio de los animales de los grupos II y IV respectivamente, del Ensayo 1. En el carril 3 de ambas figuras, mostramos el corrido electroforético correspondiente, ensayado frente a la sangría cero de los animales de los grupos II y IV.

Figura 14.- Polipéptidos antigénicos revelados por los sueros de los cobayas inmunizados vía oral con leche de cabra (LC), reacción homóloga, y las de reactividad cruzada, con las soluciones antigénicas heterólogas: leche de vaca (LV), lactosuero de leche de cabra (LLC) y lactosuero de leche de vaca (LLV)



Carril 1: marcadores de pesos moleculares; carril 2: marcador de β -caseína de cabra; carriles 3 y 4: se ha transferido LC; carril 5: LV; carril 6: LLC y carril 7: LLV

Figura 15.- Polipéptidos antigénicos revelados por los sueros de los cobayas inmunizados vía oral con leche de vaca (LV), reacción homóloga, y las de reactividad cruzada, con las soluciones antigénicas heterólogas: leche de cabra (LC), lactosuero de leche de vaca (LLV) y lactosuero de leche de cabra (LLC)



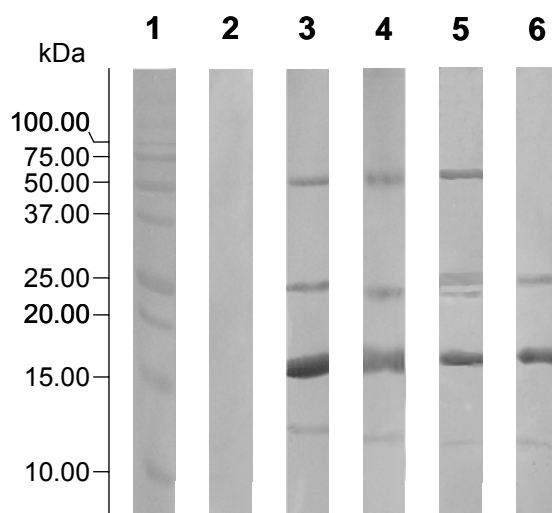
Carril 1: marcadores de pesos moleculares; carril 2: marcador de β -caseína de cabra; carriles 3 y 4: se ha transferido LV; carril 5: LC; carril 6: LLV y carril 7: LLC

Los sueros de los animales sensibilizados con LC (Figura 14), ensayados frente a LV (carril 5), reconocían una o dos bandas en la zona de altos pesos moleculares. Los sensibilizados con LV (Figura 15) y ensayados frente a LC (carril 5), presentaron una

reacción muy débil. El complejo caseína, la β -lactoglobulina y la banda correspondiente a la α -lactoalbúmina, fueron reveladas tanto con LC como con LV, siendo la última citada, reconocida muy débilmente (Figura 14) o no siéndolo (Figura 15). En general, las reacciones heterólogas frente a los lactosueros, presentaron el mismo patrón antigénico: una banda correspondiente a altos pesos moleculares, 55 kDa (cadenas pesadas de las inmunoglobulinas), la de 24 kDa, (cadenas ligeras de las inmunoglobulinas), y por último, las de bajos pesos moleculares, (correspondientes a β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina); no reconociendo la del complejo caseína, ya que éste no estaba presente en los lactosueros. A partir de estos resultados deducimos, que independientemente de que la reacción heteróloga se detectaba en general más débil que la homóloga, las proteínas responsables de la producción de anticuerpos parecen ser las mismas. Con la técnica ELISA también resultaron las reacciones heterólogas bastante más débiles que las homólogas. En este sentido, Bevilacqua y colaboradores (2000, 2001), utilizando cobayas sensibilizados oralmente con proteínas de leche de cabra y vaca, determinan los títulos de anticuerpos dirigidos frente a β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y caseínas, deduciendo en ambos casos, unos títulos altos frente a β -lactoglobulina, poniéndose de manifiesto una sensible reactividad cruzada.

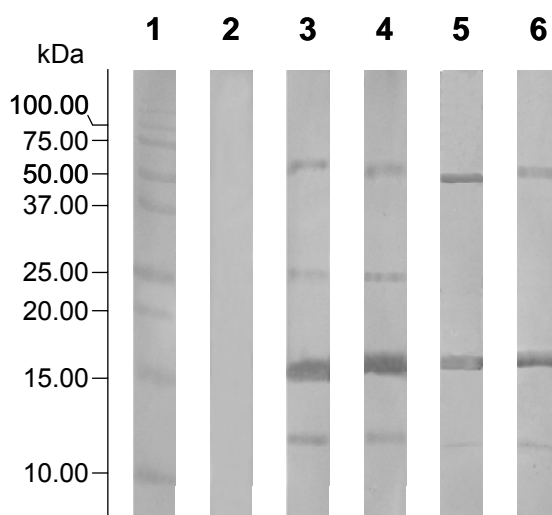
En las Figuras 16 y 17 se muestran los polipéptidos antigénicos de reactividad cruzada, reconocidos por los sueros correspondientes a la sangría de sacrificio, de los animales de los grupos II y IV del Ensayo 3. En el carril 3 de ambas figuras, mostramos el correspondiente corrido electroforético, ensayado frente a la sangría cero de los animales de los grupos II y IV.

Figura 16.- Polipéptidos antigénicos revelados por los sueros de los cobayas inmunizados vía oral con lactosuero de leche de cabra (LLC), reacción homóloga, y las de reactividad cruzada, con las soluciones antigénicas heterólogas: lactosuero de leche de vaca (LLV), leche de cabra (LC) y leche de vaca (LV)



Carril 1: marcadores de pesos moleculares; carril 2 y 3: se ha transferido LLC; carril 4: LLV; carril 5: LC y carril 6: LV

Figura 17.- Polipéptidos antigénicos revelados por los sueros de los cobayas inmunizados vía oral con lactosuero de leche de vaca (LLV), reacción homóloga, y las de reactividad cruzada, con las soluciones antigénicas heterólogas: lactosuero de leche de cabra (LLC), leche de vaca (LV) y leche de cabra (LC)



Carril 1: marcadores de pesos moleculares; carril 2 y 3: se ha transferido LLV; carril 4: LLC; carril 5: LV y carril 6: LC

En cuanto a los lactosueros, los sueros de los animales sensibilizados frente a LLC, ensayados con los antígenos LLC y LLV, reconocieron los polipéptidos de la zona de las

cadena pesada y ligera de las inmunoglobulinas, y a continuación, la β -lactoglobulina, seguida de la α -lactoalbúmina. Con LC, se detectaban cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, caseínas, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina. En el caso de la solución antigénica LV, se revelaba el mismo patrón que con LC, salvo en las zonas de las inmunoglobulinas de cadenas pesadas y ligeras, que no reconoce ninguna banda (Figura 16).

Con los sueros de los animales sensibilizados frente a LLV, no se detectaron las bandas correspondientes a las caseínas frente a las cuatro soluciones antigénicas, ni las correspondientes a las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas frente a LC y LV. Por el contrario, se mostraron presentes las correspondientes a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina (Figura 17). No obstante, estos resultados no son siempre indicativos de la existencia de una reacción alérgica. A este respecto, la información disponible resulta aún inconsistente. Lo interesante a destacar, en opinión de Park y Haenlein (2006), es que desde un punto de vista clínico, pocas veces se ha demostrado que la leche de cabra no resulte adecuada para los pacientes afectados de alergia a la de vaca.

Ensayos realizados en sueros de cobayas inmunizados por vía intraperitoneal con LC y LV

Técnica ELISA

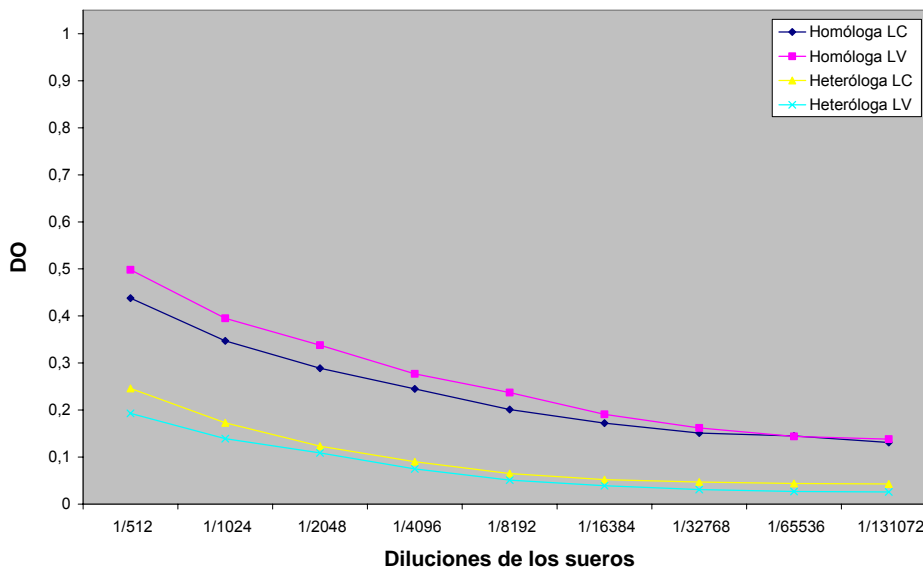
Se llevó a cabo con los sueros de 16 cobayas distribuidos en dos grupos: Grupo I: inmunizados con LC y, Grupo II: con LV, siguiendo el diseño experimental que indicamos en Material y métodos. Los sueros se ensayaron a la dilución 1/512, continuando con dobles diluciones seriadas. Las placas ELISA se sensibilizaron con el mismo antígeno frente al cual se llevó a cabo la inmunización (reacción homóloga), o distinto antígeno frente al cual se habían producido los anticuerpos (reacción heteróloga). El valor límite de positividad se determinó para cada animal, sobre su sangría cero previa a la inmunización. La Tabla 31 recoge los valores medios correspondientes a esta sangría.

Tabla 31.- Media de valores límites de las sangrías cero de los distintos animales inmunizados vía intraperitoneal frente a leche de cabra (LC) y leche de vaca (LV)

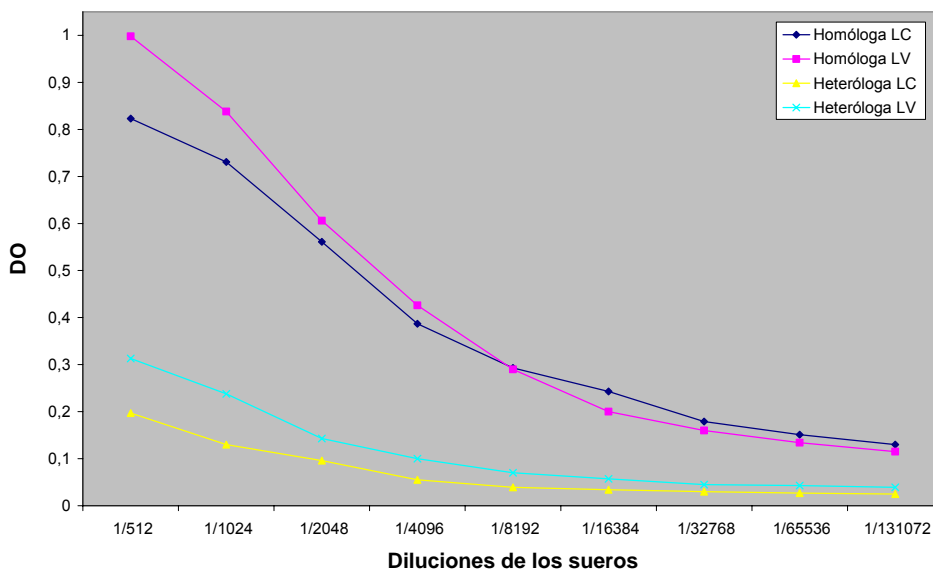
Soluciones Antigénicas	Homóloga		Heteróloga	
	IgG (Fc)	IgG1	IgG (Fc)	IgG1
LC	0,1648	0,1923	0,0651	0,0743
LV	0,1462	0,1852	0,0436	0,0336

Tras la realización de la técnica, todos los animales fueron positivos para las dos inmunoglobulinas estudiadas. En las Gráficas 10 y 11 se representan los valores medios de DO, a las distintas diluciones de los sueros de los animales inmunizados frente a LC y LV (reacciones homólogas y heterólogas), respecto a las dos inmunoglobulinas analizadas.

Lo primero a indicar, es que en el caso de la inmunización por vía intraperitoneal, la dilución de los sueros se comenzaba a 1/512, dilución bastante más alta que la utilizada en la vía oral, debido lógicamente, a la distinta ruta de inmunización utilizada.



Gráfica 10.- Valores medios de densidad óptica obtenidos en los sueros de los animales que se inmunizaron vía intraperitoneal, con leche de cabra (LC) y leche de vaca (LV), para la clase de inmunoglobulinas IgG (Fc)



Gráfica 11.- Valores medios de densidad óptica obtenidos en los sueros de los animales que se inmunizaron vía intraperitoneal, con leche de cabra (LC) y leche de vaca (LV), para la clase de inmunoglobulinas IgG1

Al analizar estas dos gráficas se observa que respecto de la reacción homóloga, los valores correspondientes a LV resultan, sobre todo a las diluciones más bajas, superiores a los de LC. Referente a la reacción heteróloga y para IgG (Fc), los valores correspondientes a LV

y LC se detectaban en general, bastante próximos, lo que no sucedía para IgG1, caso en el que los valores correspondientes a LV, eran superiores a los de LC. Junto a esto, cabe destacar que, sobre todo, en la reacción homóloga, los valores de IgG1 resultaban más altos que los de IgG (Fc), de manera especial a las diluciones más bajas, lo cual es lógico, ya que las inmunoglobulinas IgG1 fundamentalmente son las que están involucradas en la reacción de hipersensibilidad de tipo I. Finalmente, para cada isotipo, igualmente se observa que los valores de la reacción homóloga, resultan mayores que los correspondientes a la heteróloga.

Bevilacqua y colaboradores (2000, 2001), en cobayas inmunizados oralmente con dos tipos de leche de cabra, según su contenido en α_{S1} -caseína, deducen de acuerdo con el título de anticuerpos IgG1, una menor sensibilización en el caso de consumo de la leche de cabra sin α_{S1} -caseína. Por el contrario, al inmunizar vía parenteral, la diferencia comentada desaparecía, opinando los autores ser la detectada por vía oral, debida a resultar la proteína de la leche de cabra sin α_{S1} -caseína, más digestible que la que poseía dicha fracción. En nuestro caso y como acabamos de indicar, la vía intraperitoneal determinaba unas respuestas más intensas. Junto a esto, y sobre las diferencias entre leche de cabra y vaca, quizá habría que señalar que por vía intraperitoneal, éstas tienden a ser menores, sobre todo a títulos más altos. Las mayores diferencias reconocidas por vía oral, podrían tener que ver con el hecho de que la digestibilidad de la proteína de la leche de cabra resultaba, como ya hemos comentado, superior a la de vaca.

Se ha realizado un análisis estadístico (análisis de la varianza) con los valores de DO de los sueros a la dilución 1/4096, recogiendo en las Tablas 32, 33, 34 y 35 los resultados de ELISA correspondientes.

Tabla 32.- Valores de densidad óptica en sueros a la dilución 1/4096 determinados por ELISA, para IgG (Fc) e IgG1, frente a leche de cabra y leche de vaca (vía intraperitoneal). Diferencias entre grupos para un mismo isotipo

	Grupo I ¹	Grupo II ²	DER	Nivel de significación
Homóloga ³ IgG(Fc)	0,245	0,277	0,017	NS
Homóloga ³ IgG1	0,387	0,426	0,116	NS

¹Sueros del grupo de animales que se inmunizaron frente a LC, vía intraperitoneal

²Sueros del grupo de animales que se inmunizaron con LV, vía intraperitoneal

³Placas ELISA sensibilizadas con el mismo antígeno frente al cual los animales desarrollaron los anticuerpos

DER: Desviación estándar residual; NS: No significativo

Si bien para cada isotipo, las diferencias entre grupos no resultaron estadísticamente significativas ($P > 0,05$), para el caso de la IgG (Fc), se detectaba una diferencia a $P = 0,20$ indicativa de existir una tendencia a obtener valores más altos en el grupo II (Tabla 32).

Tabla 33.- Valores de densidad óptica en sueros a la dilución 1/4096 determinados por ELISA para IgG (Fc) e IgG1, frente a leche de cabra y leche de vaca (vía intraperitoneal). Diferencias entre isotipos para un mismo grupo

	Homóloga ¹		DER	Nivel de significación
	IgG (Fc)	IgG1		
Grupo I ²	0,245	0,387	0,095	**
Grupo II ³	0,277	0,426	0,086	**

¹Placas ELISA sensibilizadas con el mismo antígeno frente al cual los animales desarrollaron los anticuerpos

²Sueros del grupo de animales que se inmunizaron frente a LC, vía intraperitoneal

³Sueros del grupo de animales que se inmunizaron con LV, vía intraperitoneal

DER: Desviación estándar residual; ** $P < 0,01$

Al comparar los valores correspondientes a cada isotipo dentro de cada grupo, se detectaba en ambos casos, una diferencia significativa ($P < 0,05$), indicativa de que los valores medios de IgG1 resultaban mayores que los de IgG (Fc) (Tabla 33).

Tabla 34.- Valores de densidad óptica en sueros a la dilución 1/4096 determinados por ELISA para IgG (Fc) e IgG1, frente a leche de cabra (LC) y leche de vaca (LV) (vía intraperitoneal). Diferencias entre grupos para un mismo isotipo

	Grupo I ¹	Grupo II ²	DER	Nivel de significación
Heteróloga ³ IgG (Fc)	0,090	0,075	0,037	NS
Heteróloga ³ IgG1	0,055	0,100	0,034	*

¹Grupo de animales que se inmunizaron frente a LC, vía intraperitoneal

²Grupo de animales que se inmunizaron frente a LV, vía intraperitoneal

³Placas ELISA sensibilizadas con distinto antígeno frente al cual los animales desarrollaron los anticuerpos

DER: Desviación estándar residual; NS: No significativo; *P<0,05

Los valores de IgG (Fc) no resultaban diferentes entre grupos (P>0,05). Por el contrario, para IgG1, el valor medio correspondiente al grupo II se detectaba mayor (P<0,05) que el del grupo I (Tabla 34). Lo que nuevamente podría indicar la menor alergenicidad de la leche de cabra frente a la de vaca, incluso por esta vía.

Tabla 35.- Valores de densidad óptica determinados en sueros a la dilución 1/4096 por ELISA para IgG (Fc) e IgG1, frente a leche de cabra (LC) y leche de vaca (LV) (vía intraperitoneal). Diferencias entre isotipos para un mismo grupo

	Heteróloga ¹		DER	Nivel de significación
	IgG (Fc)	IgG1		
Grupo I ²	0,090	0,055	0,029	*
Grupo II ³	0,277	0,100	0,055	***

¹Placas ELISA

²Sueros del grupo de animales que se inmunizaron frente a LC, vía intraperitoneal

³Sueros del grupo de animales que se inmunizaron frente a LV, vía intraperitoneal

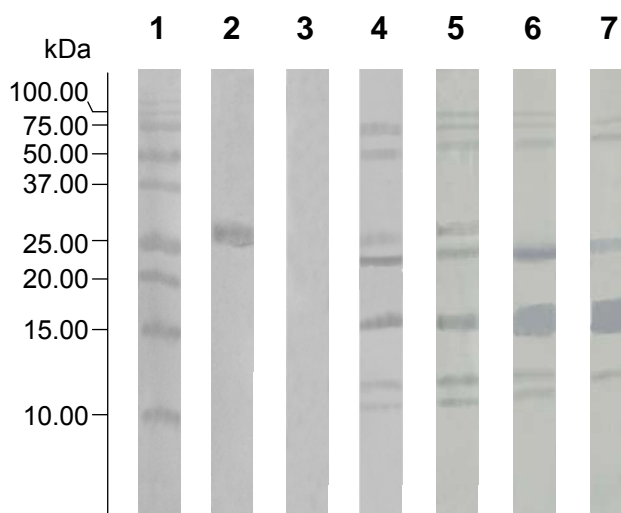
DER: Desviación estándar residual; *P<0,05; ***P<0,001

Dentro de cada grupo al comparar los valores medios pertenecientes a cada isotipo, se detectaba que los correspondientes a IgG (Fc) resultaban estadísticamente mayores (P<0,05) que los de IgG1 (Tabla 35).

Técnica de Western blot

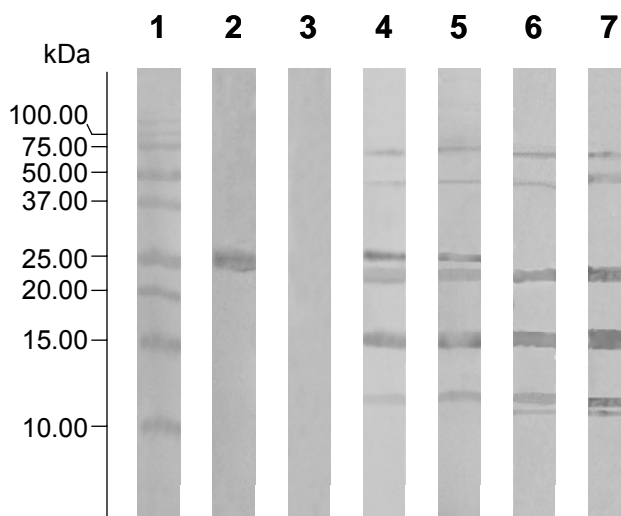
Se utilizaron los sueros de la sangría de sacrificio de los cobayas inmunizados por vía intraperitoneal con LC y LV, ensayándose frente a las cuatro soluciones antigénicas. En las Figuras 18 y 19, se muestran los patrones polipéptidicos de la reacción homóloga (carril 4) y heterólogas (carriles 5, 6 y 7). En el carril 3 de ambas figuras, se representa el correspondiente corrido electroforético, ensayado con la sangría cero de los animales frente al antígeno LC (Figura 18) y LV (Figura 19).

Figura 18.- Polipéptidos antigénicos revelados por la sangría de sacrificio del inmunisero frente a leche de cabra (LC) por vía intraperitoneal. Anticuerpo secundario anti-IgG 1 de cobaya



Carril 1: marcadores de pesos moleculares; carril 2: se ha transferido de cabra; carriles 3 y 4: LC; carril 5: LV; carril 6: LLC y carril 7: LLV

Figura 19.- Polipéptidos antigénicos revelados por la sangría de sacrificio del inmunisero frente a leche de vaca (LV) por vía intraperitoneal. Anticuerpo secundario anti-IgG1 de cobaya



Carril 1: marcadores de pesos moleculares; carril 2: se ha transferido de cabra; carriles 3 y 4: LV; carril 5: LC; carril 6: LLV y carril 7: LLC

De acuerdo con los resultados obtenidos, se deduce que la producción de anticuerpos estuvo dirigida frente a los mismos polipéptidos que en el caso de los conejos inmunizados por vía subcutánea.

Cuando se probaban los sueros inmunes frente a LC (Figura 18) con la leche de ambas especies, se revelaban tres bandas en la zona de altos pesos moleculares, dos en la de medios, que corresponden a las caseínas y cadenas ligeras de las inmunoglobulinas y, por último, las correspondientes a β -lactoglobulina y las dos isoformas de α -lactoalbúmina. Al utilizar como antígeno los lactosueros, no aparecía, de manera lógica, la banda de las caseínas.

Cuando los sueros inmunes frente a LV (Figura 19), fueron ensayados con las cuatro soluciones antigénicas, los patrones polipeptídicos obtenidos resultaron muy similares a los de la Figura 18. La aparición de las dos isoformas correspondientes a la α -lactoalbúmina resultó menos frecuente.

4.3.- Interacción entre la composición y/o utilización nutritiva de la leche de cabra y vaca y su capacidad inmunógena

Según Walter (1987), la alergia alimentaria queda determinada en un principio, por la absorción intestinal de sustancias antigénicas, seguida de una serie de reacciones locales de carácter inmunológico. Las sustancias antigénicas implicadas en la alergia alimentaria, resultan ser, en opinión de Heyman y Desjeux (1992), diferentes macromoléculas de naturaleza proteica, quedando en este proceso implicadas, una serie de interacciones, las que suceden tanto antes como después del transporte a través del epitelio.

Respecto de la interacción que entre composición y/o valor nutritivo de cada tipo de leche y su capacidad inmunógena pudiera existir, ya hemos comentado que la diferencia de respuesta entre la vía de inmunización oral e intraperitoneal, con ambos tipos de leche, se debería a la distinta utilización que, en un principio, a nivel digestivo de la proteína tiene lugar, aspecto aquí claramente deducido. En este sentido, igualmente hemos establecido cómo la grasa de la leche de cabra, es capaz de determinar en razón de su composición, una mejor utilización de la proteína a nivel metabólico, lo que en nuestra opinión, podría también intervenir en la diferencia de respuesta según vía de inmunización y, en consecuencia, en la menor intensidad detectada bajo el consumo oral de leche entera de cabra frente a la de leche entera de vaca.

Igualmente, y en relación con el efecto que la composición de la leche de cabra, podría ejercer sobre su particular capacidad inmunógena, habría que recordar que los linfocitos y macrófagos implicados tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, utilizan de manera selectiva como fuente de energía, distintos sustratos, como la glutamina, determinados ácidos grasos y cuerpos cetónicos (Calder, 1995). Si en este sentido, los ácidos grasos que más intervienen, son aquéllos más activos metabólicamente y menos propensos al depósito, los de cadena media contenidos en la grasa de la leche de cabra, pensamos podrían quedar implicados.

La glutamina es un aminoácido no esencial que se forma a partir del ácido glutámico, por la acción de la glutamina sintetasa (Lehninger, 1978). Calder (1995), informa de que las tasas de utilización de la glutamina por parte de los linfocitos y macrófagos, resulta alta, pudiendo llegar a ser incluso, mayor que las de glucosa, originándose de este metabolismo, distintos compuestos intermedios, llevándose a cabo incluso, una total oxidación. En nuestro caso, hemos constatado que la proteína de la leche de cabra presenta frente a la de vaca, un contenido mayor de ácido glutámico, a partir del cual podría originarse igualmente, una mayor cantidad de glutamina, la que sería utilizada como fuente de energía tanto por linfocitos como macrófagos, determinando la respuesta inmune correspondiente.

Respecto de la utilización de cuerpos cetónicos igualmente, como fuentes de energía de las células indicadas, Velázquez y colaboradores (1996), informan de que la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena media, los contenidos en mayor cantidad en la leche de cabra frente a la de vaca, originan unidades C_2 y energía. Debido a su rápido metabolismo, estos compuestos pueden llegar a saturar las vías bioquímicas, lo que determina que entren en el ciclo de Krebs, siendo entonces metabolizados por una vía alternativa hasta cuerpos cetónicos (acetoacetato y β -hidroxibutirato), que podrían ser utilizados por los linfocitos (Calder, 1995), repercutiendo en las correspondientes respuestas inmunológicas.

5.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

5.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Con el fin de determinar tanto el valor nutritivo como inmunológico de la leche de cabra frente a la de vaca, se llevaron a cabo una serie de ensayos en distintos modelos experimentales, comprendiendo tanto pruebas *in vivo* como *in vitro*. Junto a la determinación de la utilización nutritiva en razón de la naturaleza de la proteína y de la grasa, se analizó la capacidad inmunógena de ambos tipos de leche, así como de sus respectivos lactosueros. De los resultados obtenidos concluimos:

Valoración nutritiva

1. La composición específica que tanto la proteína como la grasa de la leche de cabra, presenta frente a la de vaca, establece a nivel digestivo un mejor aprovechamiento de ambos nutrientes.
2. La naturaleza de la grasa de la leche de cabra, en razón de su alto contenido en triglicéridos de cadena media, determina una mejor utilización de la proteína absorbida. Junto a esto, en ausencia de esta fuente de grasa, la proteína de leche de cabra, alcanza frente a la de vaca, una igualmente, mejor utilización metabólica.
3. Debido a la particular utilización que a nivel metabólico, los ácidos grasos de cadena corta y media presentan, en los casos de empleo de grasa de leche de cabra, se deduce una menor eficiencia de utilización de la ingesta de energía metabolizable para la retención, estimándose al mismo tiempo, una termogénesis asociada a la oxidación de la grasa más alta y, más baja en lo que respecta a la proteína.
4. Bajo consumo de las cuatro dietas ensayadas, se consigue un igual crecimiento, mostrando el peso de los animales, una diferente composición corporal. De acuerdo con esto, el contenido en proteína del peso vivo, se obtiene más alto bajo el empleo de la proteína de leche de cabra. Por el contrario, el contenido en grasa resulta más bajo al utilizar igualmente, la procedente de leche de cabra.

5. Debido a los efectos que la naturaleza de la grasa de la leche de cabra, determina sobre su utilización nutritiva, se deduce el diferente valor que la misma puede presentar, según se trate de leche entera, semidesnatada o desnatada.

Valoración inmunológica

1. El perfil proteico de la leche correspondiente a las dos especies animales consideradas, así como de sus respectivos lactosueros, no difieren de los señalados por otros autores.
2. Las soluciones antigénicas empleadas, han sido capaces de producir anticuerpos, tanto en conejos inoculados por vía subcutánea como en cobayas sensibilizados por vía oral e intraperitoneal.
3. A partir de las pruebas de anafilaxia sistémica y cutánea pasiva, se concluye que la leche de cabra presenta frente a la de vaca, una menor capacidad alérgica.
4. En los sueros de los cobayas inmunizados por vía oral frente a leche de cabra, el nivel de anticuerpos determinados por ELISA, resulta menor que el de los sensibilizados con leche de vaca. Mediante Wester blot, se han revelado los polipéptidos diana frente a los que se forman los correspondientes anticuerpos. De ambos tipos de pruebas, se confirma que en la hipersensibilidad de tipo I, quedan involucradas las inmunoglobulinas de la subclase IgG1.
5. De los ensayos *in vitro*, se ha deducido que existe una notable reactividad cruzada entre los anticuerpos formados frente a los polipéptidos antigénicos, lo que no implica que exista una real reactividad cruzada clínica.
6. La diferencia de respuesta según ruta de inmunización oral y parenteral, pone de manifiesto la importancia que la utilización a nivel nutritivo de la proteína de cada clase de leche, tiene sobre su alergenidad.

6.- BIBLIOGRAFÍA

6.- BIBLIOGRAFÍA

- Agricultural Research Council (ARC). 1981. The Nutrients Requirements of Pigs. Commonwealth Agricultural Bureaux. Londres.
- Alfárez, M.J.M., Barrionuevo, M., López-Aliaga, I., Sanz Sampelayo, M.R., Lisbona, F., robles, J.C., Campos, M.S. 2001. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. *J. Dairy Sci.* 64: 451-461.
- Alonso de Herrera, G. 1513. Agricultura General (Edición crítica de E. Terrón, 1981), Servicio de Publicaciones del Ministerio de Agricultura. Cap. 13 y 14. Madrid.
- Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M.J., Juárez, M. 1999. Fatty acid composition of caprine milk: Major, branched-chain, and trans fatty acids. *J. Dairy Sci.* 82: 878-884.
- Álvarez de Cienfuegos. 1958. Misceláneas de estudios árabes y hebraicos. 7: 85.
- Álvarez, M.J., Lombardero, M. 2002. IgE-mediated anaphylaxis to sheep's and goat's milk. *Allergy* 1091-1092.
- Ambrosoli, R., Di Stasio, L., Mazzoco, P. 1988. Content of α_{S1} -casein and coagulation properties in goat milk. *J. Dairy Sci.* 71: 24-28.
- American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. 1984. (Committee on Adverse Reactions to Foods), National Institute of Allergy and Infections Diseases. Adverse Reactions to foods. National Institutes of Health. NIH Publication 84-2442.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1975. Official Methods of Analysis, 12th ed. Washington, D.C.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis, 18th ed. Gaithersburg, Maryland.
- Astrup, A., Buemann, B., Flint, A., Raben, A. 2002. Low-fat diets and energy balance: how does the evidence stand in 2002? *Proc. Nutr. Soc.* 61: 299-309.
- Aurousseau, B., Vermorel, M., Theriez, M., Vezinhet, A. 1989. Effects of substitution of tricapyling or coconut oil for tallow in milk replacers offered to preruminant lambs. *Ann. Zootech.* 38: 49-59.
- Babayan, V.K. 1981. Medium chain length fatty acids esters and their medical and nutritional applications. *J.Amer. Oil Chem. Soc.* 59: 49A-51A.
- Bahna, S.L. 1991. New aspects of diagnosis of milk allergy in children. *Allergy Proc.* 12: 217-220.

- Bahna, S.L., Gandhi, M.D. 1983a. Milk hypersensitivity. I. Pathogenesis and symptomology. *Ann. Allergy* 50: 218-224.
- Bahna, S.L., Gandhi, M.D. 1983b. Milk hypersensitivity. II. Practical aspects of diagnosis, treatment and prevention. *Ann. Allergy* 50: 295-301.
- Barrionuevo, M., Alférez, M.J.M., López Aliaga, I., Sanz Sampelayo, M.R., Campos, M.S. 2002. Beneficial effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. *J. Dairy Sci.* 85: 657-664.
- Basch, J.J., Douglas, F. W. Jr., Procino, L.G., Holsinger, V.H., Farrell, H.M. Jr. 1985. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis and comparison with Harland-Ashworth procedure. *J. Dairy Sci.* 68: 23-31.
- Bauman, D.E., Griinari, J.M. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat. Low-fat syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70: 15-29.
- Berschauer, F., Close, W.H., Stephen, D.B. 1983. The influence of protein: energy value of the rations and level of feed intake on the energy and nitrogen metabolism of the growing pig. 2. N metabolism at two environmental temperatures. *Br. J. Nutr.* 49: 217-283.
- Bevilacqua, C., Martin, P., Candalh, C., Fauquant, J., Piot, M., Bouvier, F., Manfredi, E., Pilla, F., Heyman, M. 2000. Allergic sensitisation to milk protein in guinea-pigs fed cow milk and goat milks of different genotypes. Proc. 7th Int. Conference on Goats. (C. Grumer, Y. Chabert, eds.). Institut de l'Élevage-INRA. Paris. Vol.II, pp. 874.
- Bevilacqua, C., Martin, P., Candalh, C., Fauquant, J., Piot, M., Roucayrol, A.M., Pilla, F., Heyman, M. 2001. Goats' milk of defective α_{S1} -casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to β -lactoglobulin in guinea pigs. *J. Dairy Res.* 68: 217-227.
- Bland, P.W. 1987. Antigen presentation by gut epithelial cells: secretion by rat enterocytes of a factor with IL-like activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 216: 129-135.
- Bligh, J., Clousley-Thomson, J.L., McDonald, A.G. 1976. Environmental physiology of animals. Blackwell Scientific Publication. Londres. pp. 7.
- Bligh, J., Harthoorn, A.M. 1965. Continuous radiotelemetric records of the deep body temperature of some unrestrained African mammals under near-natural conditions. *J. Physiol.* 176: 145-148.
- Bloch, K.J., Walker, W.A. 1981. Effect of locally induced intestinal anaphylaxis on the uptake of a bystander antigen. *J. Allergy Clin. Immun.* 67: 312-316.

- Boland, M., MacGibbon, A., Hill, J. 2001. Designer milks for the new millennium. *Livest. Prod. Sci.* 72: 99-109.
- Boletín Oficial del Estado. 1988. Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines.
- Boulanger, A., Grosclaude, F., Mahé, M.F. 1984. Polymorphisme des caséines α -s₁ et α s₂ de la chèvre. *Gen. Sel. Evol.* 16: 157-175.
- Boza, J. 1983. Requerimientos hídricos de la cabra. *AYMA* 24: 3-4.
- Boza, J. 1991. Papel de los ruminantes en los ecosistemas áridos. Nutrición de rumiantes en zonas áridas y de montaña. (F.F. Bermudez, ed.). CSIC. pp. 7-15.
- Boza J. 1993. Planificación ganadera del sureste ibérico. Nutrición de Rumiantes en Zonas Áridas y de Montaña y en relación con la Conservación del Medio Natural. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Colección Congresos y Jornadas. 29/93. pp. 59-66.
- Boza, J. 2005. Papel del ganado caprino en las zonas dsfavorecidas. XXX Jornadas Científicas Nacionales y IX Internacionales de la SEOC. Granada.
- Boza Puerta, J. 1992. Obtención de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas. Estudio del valor nutritivo y de la capacidad antigénica. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- Boza, J., Sanz Sampelayo, M.R. 1984. Antecedentes históricos de la cabra en Andalucía. *Jábega* 69-75.
- Boza J., Silva, J.H., Azocar, P. 1985. Recursos alimenticios en zonas áridas. Simp. Int. Sobre Explotación caprina en zonas áridas. Servicio de Publicacions Cabildo de Fuerteventura. pp. 191-197.
- Boza, J., Sanz Sampelayo, M.R. 1997. Aspectos nutricionales de la leche de cabra. *ACVAO* 10: 109-139.
- Boza, J.J., Jiménez, J., Martínez, O., Suárez, M.D., Gil, A. 1994. Nutritional value and antigenicity of two milk protein hydrolysates in rats and guinea pigs. *J. Nutr.* 124: 1978-1986.
- Boza, J.J., Martínez-Augustín, O., Baró, L., Suárez, M.D., Gil, A. 1995a. Protein v. enzymic protein hydrolysates. Nitrogen utilization in starved rats. *Br. J. Nutr.* 73: 65-71.
- Boza, J.J., Martínez-Augustín, O., Gil, A. 1995b. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 43: 872-875.

- Boza, J.J., Martínez, O., Baró, L., Suárez, M.D., Gil, A. 1995c. Influence of casein and casein hydrolysate diets on nutritional recovery of starved rats. *JPEN* 19: 216-221.
- Brenneman, J.C. 1978. Basics of food Allergy. Charles Thomas. Publ. Springfield. Illinois. 170-174.
- Brouwer, E. 1965. Report of sub-committee on constants and factors. Energy Metabolism of Farm Animals. (K.L. Blaxter, ed.). Academic Press. Londres. pp. 441-442.
- Brown, J.R., Law, A.J.R., Knight, C.H. 1995. Changes in casein composition of goat's milk during the course of lactation: physiological inferences and technological implications. *J. Dairy Res.* 62: 431-439.
- Brujizeel-Kooman, C., Ortolani, C., Aas, K. 1995. Adverse reactions to food (an EAACI position paper). *Allergy* 50: 623-635.
- Buergin-Wolff, A., Signer, E., Friess, H.M., Berger, R., Birbaumer, A. Just, M. 1980. The diagnostic significance of antibodies to various cow's milk proteins. *Eur. J. Pediatr.* 133: 17-24.
- Burns, D.A., Ciurezak, E.W. 1992. Handbook of Near-Infrared Analysis. Practical Spectroscopy Series. Vol. 13. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
- Burns, D.A., Ciurezak, E.W. 2001. Handbook of Near-Infrared Analysis. Practical Spectroscopy Series. Vol. 27. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
- Calder, P.C. 1995. Fuel utilization by cells of the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* 54: 65-82.
- Campos, M.S., López-Aliaga, I., Alférez, M.J.M., Nestares, T., Barrionuevo, M. 2003. Effects of goats' or cows' milks on nutritive utilization of calcium and phosphorus in rats with intestinal resection. *Br. J. Nutr.* 90: 61-67.
- Cano, G.M. 1974. La Comarca de Baza. Artes Gráficas. Valencia.
- Chandan, R.C., Parry, R.M., Sahani, K.M. 1968. Lysozyme, lipase and ribonuclease in milk of various species. *J. Dairy Sci.* 51: 606-612.
- Chandan, R.C., Attaie, R., Sahani, K.M. 1992. Nutritional aspects of goat milk and its products. Recent Advances in Goat Production. (International Goat Association, ed.). Nueva Delhi. pp. 1869-1890.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J., Lambert, G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86: 1751-1770.

- Cohen, S.A., Meys, M., Tarvin, T.L. 1989. The Pico-Tag Method. A manual of advanced techniques for amino acid analysis. Millipore Corporation Bedford, Maryland.
- Collins, R.A. 1962. Goat's milk anaemia in retrospect. *Am. J. Clin. Nutr.* 11: 169-174.
- Commission of the European Communities. 1991. Report of the Scientific Committee for Food on Infant Formulae Claimed to be Hypoallergenic or Hypoantigenic. Food Science and Techniques. (Commission for the European Communities, ed.). Bruselas.
- Coombs, R.R.A., Gell P.G.H. 1968. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *Clinical Aspects of Immunology*, 2nd ed. (R.R.A. Coombs, P.G.H. Gell, eds.). F.A. Davis. Filadelfia. pp. 575.
- Cornell, R., Walker, W.A., Isselbacher, K.J. 1971. Small intestinal absorption of horseradish peroxidase: a cytochemical study. *Lab. Invest.* 25: 42-48.
- Coveney, J., Darnton-Hill, I. 1985. Goat's milk and infant feeding. *Med. J. Aust.* 143: 508-511.
- Darmon, N., Abdoul, E., Roucayrol, A.M., Blaton, M.A., Briend, A., Desjeux, J.F., Heiman, M. 1998. Sensitization to cows' milk proteins during refeeding of guinea pigs recovering from polydeficient malnutrition. *Pediatr. Res.* 44: 931-938.
- Davis, T.A., Nguyen, H.V., García-Bravo, R., Florotto, N.L., Jackson, E.M., Lewis, D.S., Lee, D.R., Reeds, P.J. 1994. Amino acid composition of human milk is not unique. *J. Nutr.* 124: 1126-1130.
- Derse, P.H. 1962. Evaluation of protein quality (Biological Method). *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists* 45: 418-422.
- Devendra, C., Burns, M. 1970. Goat production in the tropics. Commonwealth Bureau. *Anim. Breeding and Genetics, Tech. Commun.* N° 19.
- El-Agamy, E.I. 2007. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Rumin. Res.* 68: 64-72.
- Ellis, E.F. 1979. Allergic emergencies. *Pediatr. Clinics N. Am.* 26: 903.
- Fabre, A. 1997. Perspectives actuelles d'utilisation du lait de chèvre dans l'alimentation infantile. Intérêts nutritionnel et diététique du lait chèvre. *Les Colloques.* (INRA, ed.). N° 81. pp. 123-126.
- Fahmi, A.H., Sirry, I., Safwat, A. 1956. The size of fat globules and the creaming power of cow, buffalo, sheep and goat milk. *Indian J. Dairy Sci.* 9: 80-86.

- Février, C., Mourot, J., Jaguelin, Y., Mounier, A. 1993. Nutritive value of goat's and cow's milk crude protein and ileal digestibility of their amino acids by the growing pig. *Proc. Nutr. Soc.* 52: 204A.
- Février, C., Jaguelin, Y., Lebreton, Y., Colleaux, Y., Prigent, J.P. 2000. Valeur nutritive pour le porcelet et digestibilité iléale des acides aminés de laits de chèvre différant en caséine α_{S1} . Proc. 7th Int. Conference on Goats. (C. Grumer, Y. Chabert, eds.). Institut de l'Élevage-INRA. Paris. Vol.II. pp. 876-879.
- Firer, M.A., Hosking, C.S., Hill, D.J. 1981. Effect of antigen load on development of milk antibodies in infants allergic to milk. *Br. Med. J.* 283: 693-696.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.
- French, M.H. 1970. Observaciones sobre la cabra. 2^a ed. FAO, Estudios Agropecuarios, 8. Roma.
- Fuller, M.F., Crofts, R.M.J. 1977. The protein-sparing effect of carbohydrate. 1. Nitrogen retention of growing pigs in relation to diet. *Br. J. Nutr.* 38: 479-488.
- García Unciti, M.S. 1996. Utilidad terapéutica de los triglicéridos de cadena media (MCT). Dietas cetogénicas en la epilepsia infantil. *Nutr. Clin.* 16: 7-35.
- Gómez García, V., Sanz Sampelayo, M.R., Fernández Navarro, J.R., Carmona López F.D., Gil Extremera, F., Rodríguez Osorio, M. 2003. Polyunsaturated fatty acids and parasitism: effect of a diet supplemented with fish oil on the course of rat trichinellosis. *Vet. Parasitol.* 117: 85-97
- González Castro, J., Gómez García, V., Atienza, M. 1966. Dispositivo para electroforesis, inmunoelectroforesis e inmunodifusión en microplacas de agar con matrices de plástico. *Rev. Iber. Parasitol.* 26: 405-426.
- Grosclaude, F., Mahé, M.F., Brignon, D. Di Statio, L., Jennet, R. 1987. A Mandelian polymorphism underlying quantitative variation of goat α_S -casein. *Gene. Sel. Evol.* 19: 399-412.
- Grosclaude, F., Ricordeau, G., Martin, P., Remeuf, F., Vassal, L., Bouillon, J. 1994. Du gène au fromage: le quantitative de la caséine α_S , sur effets, son evolution. *INRA. Prod. Anim.* 7: 3-19.
- Grzesiak, T. 1997. Lait de chèvre, lait d'avoir pour les nourrissons. Intérêts nutritionnel et diététique du lait chèvre. *Les Colloques.* (INRA, ed.). N° 81. pp. 127-148.
- Gulati, S.K., Kitessa, S.M., Ashes, J.R., Fleck, E., Byers, E.B., Byers Y.G., Scott, T.W. 2000. Protection of conjugated linoleic acids from ruminal hydrogenation and their incorporation into milk fat. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86: 139-148.

- Hachelaf, W., Boukhrela, M., Benbouabdellah, M., Coquin, P., Desjeux, J.F., Bondraa, G., Touhami, M. 1993. Digestibilité des graisses du lait de chèvre chez des infants présentant une mal-nutrition d'origine digestive. Comparaison avec le lait de vache. *Lait* 73: 593-599.
- Haenlein, G.F.W. 1992. Role of goat meat and milk in human nutrition. Proc. V Conf. Intl. on Goats. Nueva Delhi. pp. 575-580.
- Haenlein, G.F.W. 1996. Nutricional Value of dairy products of ewes and goats milk. *Int. J. Anim.Sci.* 11: 395-411.
- Haenlein, G.F.W. 2001. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *J. Dairy Sci.* 84: 2097-2115.
- Haenlein, G.F.W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin Res.* 51: 155-163.
- Hafez, E.S.E. 1968. Adaptation of domestic animals. Lea, Febiger. Filadelfia.
- Hamburger, F. 1901. Wien. Kin. Wochenschr. 49, 1202. Tomado de Saperstein, S. 1974. Lactation: A comprehensive treatise. (B.L. Larson, V.R. Smith, eds). Vol. III. Academic Press. Nueva York. pp. 257-280.
- Hanson, L.A., Mannson, I. 1961. Immune electrophoretic studies of bovine milk and milk products. *Acta Paediatr.* 50: 484-490.
- Hardy, R.N. 1974. Temperature and animal life. Studies in Biology N° 35. Edward Arnold Publishers. Londres.
- Hawkes, J. 1977. Historia de la humanidad. Ed. Planeta vol. I y IV. Barcelona.
- Hayes, K.C., Pronczuk, A., Lindsey, S., Diersen-Schade, D. 1991. Dietary saturated fatty acids (12:0, 14:0, 16:0) differ in their impact on plasma cholesterol and lipoproteins in non-human primates. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 491-498.
- Heiner, D.C. 1983. Food allergy and respiratory disease. *Ann. Allergy* 51: 273-278.
- Heyman, M., Ducroc, R., Desjeux, J.F., Morgat, J.L. 1982. Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro. *Am. J. Physiol.* 242: 558-564.
- Heyman, M., Grasset, E., Duroc, R., Desjeux, J.F. 1988. Antigen absorption by the jejunal epithelium of children with cow's milk allergy. *Pediatr. Res.* 24: 197-202.
- Heyman, M., Andriantsoa, M., Crain-Denoyelle, A.M., Desjeux, J.F. 1990. Effect of oral and parental sensitization to cow's milk on mucosal permeability in guinea-pigs. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 92: 242-246.
- Heyman, M., Desjeux, J.M. 1992. Significance of intestinal food protein transport. *J. Pediatr. Gastr. Nut.* 15: 48-57.

- Holsinger, V.H. 1982. The chemistry and processing of goat milk. Proc. Special Symp. on Research with Small Animals. USDA 1422 Beltseille, M.D.
- Isolauri, E., Gotteland, M., Heyman, M., Pochart, P., Desjeux, J.F. 1990. Antigen absorption in rabbit bacterial diarrhea (RDEC-1): in vitro modifications. *Digest. Dis. Sci.* 35: 360-366.
- Jaudal, J.M. 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* 22: 177-185.
- Jennes, R. 1974. The composition of milk. En: Lactation (B. L. Larson, V.R. Smith, eds.). Tomo III. Academic Press. Londres. pp. 3-107.
- Jenness, R. 1980. Composition and characteristics of goat milk. Review 1968-1979. *J. Dairy Sci.* 63: 1605-1630.
- Jorgensen, H., Zheng, C.T., Theil, P.K., Jakobsen, K. 2003. Effect of specific structural triglycerides on energy metabolism in broiler chickens. Progress in Research on Energy and Protein Metabolism. (W.B. Souffrant, C.C. Metges, eds.). Wageningen. Academic Publishers. pp. 417-420.
- Juntunen, K., Ali-Yrkko, S. 1983. Goat's milk for children allergic to cow's milk. *Kiel. Milchwirt. Forschungsber.* 35: 439-440.
- Kaiser, C. 1990. Untersuchungen zur Reindarstellung von Kuhmilchproteinen für die immunologische Differential diagnose nutritiver Allergien. Dissertation, Inst. Physiol. & Biochem. Nutr., Bundesanstalt für Milchforschung, Univ. Kiel. Kiel. 153 págs.
- Kajji, H., Horie, T., Hayasun, M., Awazu, S. 1986. Effects of drug absorption on isolated rat small intestinal epithelial cells. *Int. J. Pharmacol.* 33: 253-255.
- Kawabata, T.T., Babcock, L.S., Gauggel, T.N., Asquito, E.R., Fletcher, P.A., Horna, P.A., Ratajczak, H.V., Graziano, F.M. 1995. Optimization and validation of an ELISA to measure specific guinea pig IgG1 antibody as an alternative to the in vivo passive cutaneous anaphylaxis assay. *Fund. Appl. Toxicol.* 24: 238-246.
- Kimura, R.E., Warshaw, J.B. 1988. Control of fatty acid oxidation by intramitochondrial NDDH/NAA⁺ in developing rat small intestine. *Pediatr. Res.* 23: 262-265.
- Kim, H.H., Jimenez-Flores, R. 1994. Comparison of milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 77: 2177-2190.
- Kumar, V., Chandra, P., Zachdeva, K.K. 1986. Nutritive value of goat milk. *Indian Dairyman*, 38: 390-391.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lara-Villoslada, F., Olivares, M., Jiménez, J., Boza, J., Xaus, J. 2004. Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model of atopy. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 39: 354-360.
- Lara-Villoslada, F., Olivares, M., Xaus, J. 2005. The balance between caseins and whey proteins in cow's milk determines its allergenicity. *J. Dairy Sci.* 88: 1654-1660.
- Le Houreau, N.H. 1989. Agrosilvicultura y silvopastoralismo para combatir la degradación del suelo en la cuenca mediterránea. Degradación de zonas áridas del entorno mediterráneo. Monografías de la Dirección General de Medio Ambiente. MOPU. Madrid. pp. 105-116.
- Lehninger, A.L. 1978. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. (A.L. Lehninger, ed.). 2ª Edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona.
- Leyton, J., Drury, P.J., Crawford, M.A. 1987. Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *Br. J. Nutr.* 57: 383-393.
- López-Aliaga, I., Alférez, M.J.M., Barrionuevo, M., Nestares, T., Sanz Sampelayo, M.R., Campos, M.S. 2003. Study of nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection on the distal small intestine. Beneficial effect of goat milk. *J. Dairy Sci.* 86: 2958-2966.
- Luke, B., Keith, L.G. 1982. Calcium requirements and the diets of women and children: A review of dairy resources. *J. Reprod. Med.* 27: 285-290.
- Mahé, S. 1997. Valeur nutritionnelle du lait en alimentation humaine. Intérêts nutritionnel et diététique du lait chèvre. *Les Colloques*. INRA, ed. N° 81. pp. 9-26.
- MAPA. 2004. Anuario de Estadística Agraria, 2002, Secretaría General y Técnica. Madrid.
- Marcon-Genty, D., Tomé, D., Kheroua, O., Dumontier, A.M., Heyman, M., Desjeux, J.F. 1989. Transport of β -lactoglobulin across rabbit ileum in vitro. *Am. J. Physiol.* 256: 943-948.
- Marti, P. 1997. La composition protéique du lait de chèvre: ses particularités. Intérêts nutritionnel et diététique du lait chèvre. *Les Colloques*. INRA, ed. N° 81. pp. 27-49.
- Martín-Esteban, M., García-Ara, M.C., Banque-Molas, M., Boyano-Martínez, M.T., Martín-Muñoz, F. Día-Peña, J.M. 1998. Evaluation of an extensively hydrolyzed casein-whey protein formula in immediate cow's milk protein hypersensitivity. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 26: 398-401.

- Maszewska-Kuzniarz, K., Sonta-Jakimaczyk, D. 1973. Chronic enteropathy in infants due to feeding with cow's milk formulae. *Dairy Sci.* 32: 2567 (Abstr.).
- Matassino, D., Zucchi, G., di Berardino, D. 1990. Management of consumption, demand, supply and exchanges. On the eve of the 3rd millenium the European Challenge for animal production. EAAP Publ. N° 48. Pudoc Wageningen. pp: 105-126.
- Matsuo, T., Takeuchi, H. 2004. Effects of structural medium –and long–chain triglycerides in diets with various levels of fat on body fat accumulation in rats. *Br. J. Nutr.* 91: 219-225.
- Mayrhofer, G. Spargo, D.J. 1989. Subcellular distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the human and rat small intestine. *Immunol. Cell. Biol.* 67: 251-260.
- McClenathan, D.T., Walker, W.A. 1982. Food Allergy. Cow milk and other common culprits. *Postgrad. Med.* 72: 233-239.
- McGuire, M.A., McGuire, M.K. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. Proc. Am. Soc. Anim. Sci. Annu. Mtg. 1999.
- McLaughlan, P., Anderson, K.J., Widdowson, E.M., Coombs, R.R. 1981. Effect of heat on the anaphylactic-sensitising capacity of cow's milk, goat's milk, and various formulas fed to guinea pigs. *Arch. Dis. Child.* 56: 165-171.
- Mercer, S.W., Trayhurn, P. 1987. Effect of high fat diets on energy balance and thermogenesis in brown adipose tissue of lean and genetically obese ob/ob mice. *J. Nutr.* 117: 2147-2153.
- Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo (MOPU). 1982. La Naturaleza. Unidades Ambientales. Publicaciones Dirección General de Medio Ambiente. E.P.E.S. IG.
- Montserrat, P. 1990. Pastoralism and desertification. Strategies to combat desertification in mediterranean Europe, Report EUR 11175. Luxemburgo. pp: 85-103.
- Moreno, R. 1995. Lácteos como fuente ideal de calcio/fósforo en la dieta. *Alim. Nutr. Salud.* 2: 52-58.
- Muñoz Martín, T., de la Hoz Caballer, B., Marañón Lizana, F., González Mendiola, R., Prieto Montaña, P., Sánchez Cano, M. 2004. Selective allergy to sheep's and goat's milk protein. *Allergol. Immunopatohol.* 32: 39-42.
- O'Brien, J.M. 1995. Nutritional value of milk protein hydrolysates. *J. Nutr.* 125: 1956.
- Ojeda Casas, J.A. 2001. Pasado, presente y futuro de la alergia a alimentos. *Allergol. Inmunol. Clin.* 16: 1-12.

- Osborne, T.B., Mendel, L.B., Ferry, E.L. 1919. A method of expressing numerically the growth promoting value of proteins. *J. Biol. Chem.* 37: 223-229.
- Otani, H., Hosono, A. 1989. Immunological properties of pepsin, trypsin and/or chymotrypsin digests of bovine α_{s1} -casein. *JN. J. Zootech. Sci.* 60: 1143-1150.
- Pahud, J.J., Monti, J.C., Jost, R. 1985. Allergicity of whey proteins: Its modification by tryptic in-vitro hydrolysis of the protein. *J. Pediatr. Gastr. Nut.* 4: 408-413.
- Pahud, J.J., Schwarz, K., Granato, D. 1988. Control of hypoallergenicity by animals models. *Food Allergy*. (Schmidt, E. ed.). Raven Press. Nueva York. 17: 199-207.
- Parish, W.E., Richards, C.B., France, N.E., Coombs, R.R.A. 1964. Further investigations on the hypothesis that some cases of cot-death are due to a modified anaphylactic reaction to cows' milk. *Inter. Arch. Allergy* 24: 215-221.
- Park, Y.W. 1994. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Rumin. Res.* 14: 151-159.
- Park, Y.W. 2006. Goat milk. Chemistry and Nutrition. Handbook of milk of non-bovine mammals. (Y.W. Park, G.F.W. Haenlein, eds.). Blackwell Publishing. Oxford. pp. 34-58.
- Park, Y.W., Haenlein, G.F.W. 2006. Therapeutic and Hypoallergenic Values of Goat Milk and Implication of Food Allergy. Handbook of milk of non-bovine mammals. (Y.W. Park, G.F.W. Haenlein, eds.). Blackwell Publishing. Oxford. pp. 121-135.
- Parkash, S., Jenness, R. 1968. The composition and characteristics of goat's milk: A review. *Dairy Sci.* (Abstr.) 30: 67-72.
- Perdue, M.H., Marshall, J., Masson, S. 1990. Ion transport abnormalities in inflamed rat jejunum: involvement of mast cells and nerves. *Gastroenterology* 98: 561-567.
- Pérez Martínez, L. 1995. Determinación cromatográfica de aminoácidos previa reacción con fenilisotiocianato. Influencia de β -glucanasas sobre la digestibilidad de aminoácidos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
- Perlman, F. 1977. Food allergens. Immunological aspects of foods. (N. Catsimpoolas, ed.). AVI Publ. Co., Inc. Westport, Connecticut. USA. pp. 279-316.
- Pierre, A., Portmann, A. 1970. Detection of cow's milk added to goats' milk using polyacrylamide gel electrophoresis. *Ann. Technol. Agric.* 19: 107-112.
- Podleski, W.K. 1992. Milk protein sensitivity and lactose intolerance with especial reference to goat milk. Proc. V Conf. Intl. on Goats. Nueva Delhi. pp. 610-613.

- Posati, L.P., Orr, M.L. 1976. Composition of foods, dairy and eggs products. Agriculture Handbook No 8-1. USDA-ARS, Consumer and Food Economics Institute Publishers. Washington, D.C. pp. 77-109.
- Potchoiba, M.J., Lu, C.D., Pinkerton, F., Sahlu, T. 1990. Effects of all-milk diet on weight gain, organ development, carcass characteristics and tissue composition, including fatty acids and cholesterol contents, of growing male goats. *Small Rumin. Res.* 3: 583-593.
- Puranik, L.D. 1992. Goat milk in infant feeding. Recent Advances in Goat Production. International Goat Association (ed.). Nueva Delhi. pp. 1860-1863.
- Raggi, L., Sanz Sampelayo, R., Guerrero, J.E., Boza, J. 1985. Fisiología ambiental de la cabra. *Monografías Med. Vet.* 7: 27-32.
- Ramos Morales, E., De la Torre Adarve, G., Carmona López F.D., Gil Extremera, F., Sanz Sampelayo, M.R., Boza J., 2005. Nutritional Value of goat and cow milk protein. *Options Méditerranéennes* 67: 167-170.
- Razafindrakoto, O., Revelomanana, N., Rasolofa, A., Rakotoarimanna, R.D., Gourgue, P., Coquin, P., Brined, A., Desjeux, J.F. 1993. Le lait de chèvre peut-il remplacer le lait de vache l'enfant malnutri? *Lait* 73: 601-611.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, Jr. G.C. 1993. 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.* 123: 1939-1951.
- Reinert, P., Fabre, A. 1997. Utilisation du lait de chèvre chez l'enfant. Experience de Creteil. Intérêts nutritionnel et diététique du lait chèvre. *Les Colloques.* (INRA, ed.). N° 81. pp. 119-121.
- Restani, P., Gaiaschi, A., Plabani, A., Beretta, B., Cavagni, G., Fiocchi, A., Poiesi, C., Velona, T., Ugazii, G., Galli, C.L. 1999. Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clin. Exp. Allergy* 29: 997-1004.
- Restani, P., Beretta, B., Fiocchi, A., Ballabio, C., Galli, C.L. 2002. Cross-reactivity between mammalian proteins. *Ann. Allerg. Asthma Im.* 89: 11-15.
- Ritz, H.L., Evanns, B.L.B., Bruce, R.D., Fletcher, E.R., Fisher, G.L., Sarlo, K. 1993. Respiratory and immunologic responses of guinea pigs to enzyme-containing detergents: A comparison of intratracheal and inhalation models of exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21: 31-37.
- Roberts, S.A., Reinhardt, M.C., Panelli, R., Levinsky, R.J. 1981. Specific antigen exclusion and non-specific facilitation of antigen entry across the gut in rats allergic to food proteins. *Clin. Exp. Immunol.* 45: 131-136.

- Robertson, D.M., Paganelli, R., Dinwiddie, R., Levinsky, R.J. 1982. Milk antigen absorption in the preterm and term neonate. *Arch. Dis. Child.* 57: 369-372.
- Rodríguez Osorio, M., Sanz Ceballos, L., Gil Extremera, F., Sanz Sampelayo, M.R. 2006. Valoración de la alergenicidad de la leche de vaca frente a la de cabra. Proc. IV Congreso de Ingeniería y Tecnología de Alimentos. Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Córdoba (ed.). pp. 157.
- Rosenblum, A.H., Rosenblum, P. 1952. Gastrointestinal allergy in infancy. Significance of eosinophiles in the stools. *Pediatrics* 9: 311-319.
- Rothwell, N.J. 1979. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281: 31-35.
- Ruiz Mariscal, I. 1991. Efecto de la proporción de proteína y grasa en el aprovechamiento de los lactorreemplazantes para cabritos. Utilización nutritiva, crecimiento y desarrollo corporal. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- Sabbah, A., Hassoun, S. Drouet, M. 1997. L'allergie au lait de vache at sa substitution par le lait chèvre. En: Intérêts nutritional et diététique du lait de chèvre. INRA Editions.
- Sacchi, P., Chessa, S., Budelli, E., Bolla, P., Ceriotti, G., Soglia, D., Rasero, R., Cauvin, E., Caroli, A. 2005. Casein haplotypes in five Italian goat breeds. *J. Dairy Sci.* 88: 1561-1568.
- Sánchez Martínez, M. 1980. Historia de Andalucía. Editorial Planeta. Vol 1. Barcelona.
- Sanderson, P. 1986. A new method of analysis of feedstuffs for the determination of crude oils and fats. Recent Advances in Animal Nutrition. (W. Haresing, D.J.A. Cole, eds.). Butterworths. Londres. pp. 77-86.
- Sanz Egaña, C. 1942. El ganado cabrío. Razas, explotaciones y enfermedades. Editorial Espasa Calpe. Madrid, España.
- Sanz Sampelayo, M.R., Ruiz Mariscal, I., Gil Extremera, F., Boza, J. 1997. The effect of different concentrations of protein and fat in milk replacers on protein utilization in kid goats. *Anim. Sci.* 64: 485-492.
- Sanz Sampelayo, M.R., Fernández, J.R., Ramos, E., Hermoso, R., Gil Extremera, F., Boza, J. 2006a. Effect of providing a polyunsaturated fatty acid-rich protected fat to lactating goats on growth and body composition of suckling goat kids. *Anim. Sci.* 82: 337-344.

- Sanz Sampelayo, M.R., Fernández Navarro, J.R., Hermoso, R., Gil Extremera, F., Rodríguez Osorio, M. 2006b. Thermogenesis associated to the intake of a diet non-supplemented or supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acid-rich fat, determined in rats receiving the same quantity of metabolizable energy. *Ann. Nutr. Metab.* 50: 182-192.
- Saperstein, S. 1960. Antigenicity of the whey proteins in evaporated cow's milk and whole goat's milk. *Ann. Allerg. Asthma Im.* 18: 765-773.
- Saperstein, S. 1974. Immunological problems in milk feeding. En: Lactation: A comprehensive treatise. (B.L. Larson, V.R. Smith, eds.). Vol. III. Academic Press. Nueva York. pp. 257-280.
- Selo, I., Clement, G., Bernard, H., Chatel, J., Creminon, C., Peltre, G. Wal, J. 1999. Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clin. Exp. Allergy* 29: 1055-1063.
- Senior, A.R. 1990. Medium Chain Tryglicerides. Philadelphia, P.A: University of Pennsylvania Press. Pensilvania. pp. 3-6.
- Shimomura, Y., Tamura, T., Suzuki, M. 1990. Less body fat accumulation in rats fed a safflower oil diet than in rats fed a beef tallow diet. *J. Nutr.* 120: 1291-1296.
- Shkolniz, A., Maltz, E., Gordin, S. 1980. Desert conditions and goat milk production. *J. Dairy Sci.* 63: 1749-1753.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Malla, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klen, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1979. Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Ediciones. Madrid.
- Soothill, J.F. 1987. Slow food allergic disease. En: Food Allergy. (R.K. Chandra, ed.). Nutrition Research Education Found. St. Jonh's Newfoundland. pp. 305-310.
- Spuergin, P., Walter, M., Schiltz, E., Deichmann, K., Forster, J., Mueller, H. 1997. Allergenicity of alpha-caseins from cow, sheep and goat. *Allergy* 52: 293-298.
- Statgraphics. 2001. User manual: Statistical Graphics System by Statistical Graphics Corporation. Rock-Will, MD.
- Stead, R.H., Dixon, M.F., Bramwell, N.H., Ridell, R.H., Bienenstock, J. 1989. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology* 97: 575-585.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H. 1984. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach, 4^a ed. McGraw-Hill. Singapur.

- Su, W., Jones, P.J.H. 1993. Dietary fatty acid composition influences energy accretion in rats. *J. Nutr.* 123: 2109-2114.
- Swaisgood, H.E. 1993. Características de los fluidos líquidos de origen animal: Leche. En: *Química de los alimentos* (O.R. Fonema, ed.). Editorial Acribia. Zaragoza. pp. 889-930.
- Taitz, L.S., Armitage, B.L. 1984. Goat's milk for infants and children. *Br. Med. J.* 288: 428-429.
- Tantibhedhyangkn, P., Hashim, S.A. 1975. Medium chain triglycerides feeding in premature infants: Effects on fat and nitrogen absorption. *Pediatrics* 55: 359-370.
- Tantibhedhyangkn, P., Hashim, S.A. 1978. Medium chain triglycerides feeding in premature infants: Effects on calcium and magnesium absorption. *Pediatrics* 61: 537-545.
- Taylor, S.L. 1985. Food Allergies. *Food Technol.* February, 98-105.
- Taylor, S.L. 1986. Immunologic and allergic properties of cow's milk proteins in human. *J. Food Prot.* 49: 239-250.
- Ternouth. J.H., Roy, J.H.B., Thompson, S.Y., Toothill, J., Gillies, C.M., Edwards-Webb, J.D. 1975. Concurrent studies of the flow of digesta in the duodenum and exocrine pancreatic secretion of calves. III. Further studies on the addition of fat to skim milk and the use of non milk protein in milk substitute. *Br. J. Nutr.* 31: 181-196.
- Terracciano, L., Isoardi, P., Arrigoni, S., Zoja, A. Martelli, A. 2002. Use of hydrolysates in the treatment of cow's milk allergy. *Ann. Allerg.Asthma Im.* 89: (suppl. 1), 86-90.
- Trayhurn, P., Goodbody, A.E., James, W.P.T. 1982. A role for brown adipose tissue in the genesis of obesity? Studies on experimental animals. *Proc. Nutr. Soc.* 41: 127-131.
- Tormo, R., Conde, M., Infante, D. 2004. Alergia a la leche de vaca. *La Cabra* 1: 8-9.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Umpiérrez, A., Quirce, S., Marañón, F., Cuesta, J., García-Villamuza, Y., Lahoz, C., Sastre, J. 1999. Allergy to goat and sheep cheese with good tolerance to cow cheese. *Clin. Exp. Allergy* 29: 1064-1068.
- United Nations University (UNU). 1980. Nutritional Evaluation of Protein Feeds. (P.L. Pellet, V.R. Young, eds.). The United Nations University. Tokio.

- Valenzuela, A., Sanhuesa, J., Garrido, A. 1999. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3: cuándo y por qué es necesaria la suplementación con estos ácidos grasos. *Aceites y grasas* 6: 294-299.
- Van Assendelft, O.W., Mook, G.A., Zijlstra, W.G. 1973. International system of units (SI) in physiology. *Pflügers Arch.* 339: 265-272.
- Van der Horst, R.L. 1976. Foods of infants allergic to cow's milk. *S. Afr. Med. J.* 5: 927-928.
- Van Hekken, D.L., Thompson, M.P. 1992. Application of FastSystem[®] to the resolution of bovine milk proteins on urea-polyacrylamide gel electrophoresis¹. *J. Dairy Sci.* 75: 1204-1210.
- Velázquez, O.C., Seto, R.W., Rombeau, J.L. 1996. The scientific rationale and clinical application of short-chain fatty acids and medium-chain triglycerides. *Proc. Nutr. Soc.* 55: 49-78.
- Walker, V.B. 1965. Therapeutic uses of goat's milk in modern medicine. *Goat Society's Yearbook.* 24-26: 23-26.
- Walker, W.A. 1987. Pathology of intestinal uptake and absorption of antigens in food allergy. *Ann. Allerg. Asthma Im.* 59: 7-16.
- Wasserman, S.L., Barrett, K.E., Huott, P.A., Beuerlein, G., Kagnoff, M. Dharmasathaphorn, K. 1988. Immune-related intestinal Cl⁻ secretion. I. Effect of histamine on the T84 cell line. *Am. J. Physiol.* 254: C53-C62.
- Worthington, B.S., Boatman, E.S., Kenny, G.E. 1974. Intestinal absorption of intact proteins in normal and protein-deficient rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 27: 276-286.
- Wuthrich, B., Johansson, S.G.O. 1995. Allergy to cheese produced from sheep's and goat's milk but not to cheese produced from cow's milk. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96: 270-273.
- Yeom, K.H., Van Trierum, G., Hovenier, R., Schellingerhon, A.B., Lee, K.W., Beynen, A.C. 2002. Fatty acid composition of adipose tissue in goat kids fed milk replacers with different contents of α -linolenic and linoleic acid. *Small Rumin. Res.* 43: 15-22.